

AUS DEM INSTITUT
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BEDEUTUNG GENETISCHER UND EPIGENETISCHER ALTERATIONEN
DES TUMORSUPPRESSORGENS P16^{INK4A} IN DER KARZINOGENESE VON
ADENOKARZINOMEN DER PAPILLA VATERI**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Florian Gapp

2010

AUS DEM INSTITUT
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BEDEUTUNG GENETISCHER UND EPIGENETISCHER ALTERATIONEN
DES TUMORSUPPRESSORGENS P16^{INK4A} IN DER KARZINOGENESE VON
ADENOKARZINOMEN DER PAPILLA VATERI**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Florian Gapp

2010

1. DEKAN:	PROF. DR. BERNHARD WEBER
1. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. Arndt Hartmann</i>
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Claus Hellerbrand
Tag der mündlichen Prüfung:	13.09.2010

1	EINLEITUNG	1
1.1	ANATOMISCHE GRUNDLAGEN	1
1.2	TUMOREN DER PAPILLA VATERI	2
1.2.1	Definitionen	2
1.2.2	Epidemiologie.....	3
1.2.3	Ätiologie, Risikofaktoren und assoziierte Tumoren	3
1.2.4	Symptome und Diagnostik.....	3
1.2.5	Histopathologische Eigenschaften	4
1.2.6	Tumorentitäten	6
1.2.7	Therapie.....	7
1.2.8	Prognose.....	8
1.3	MOLEKULARE TUMORPATHOGENESE	8
1.3.1	Genetische Veränderungen	8
1.3.2	Epigenetische Veränderungen.....	9
1.3.3	Zellzyklus und Signaltransduktion.....	10
1.3.4	Onkogene und Protoonkogene	11
1.3.5	Tumorsuppressorgene	11
1.3.6	Genveränderungen bei Papillentumoren	13
1.4	DAS P16 ^{INK4A} - TUMORSUPPRESSORGEN	14
1.4.1	Funktion.....	14
1.4.2	Inaktivierung	15
1.4.3	Bedeutung.....	16
1.4.4	periampulläre Karzinome.....	16
1.5	ZIEL DER ARBEIT.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	HERKUNFT DER GEWEBEPROBEN	18
2.2	GRUNDLEGENDE ARBEITEN	18
2.2.1	Formalinfixierung und Archivierung von Gewebeproben	18
2.2.2	Herstellung von Gewebeschnitten und Entparaffinierung	18
2.2.3	Hämatoxilin-Eosin- (HE) Färbung	19
2.2.4	Mikrodissektion	19
2.2.5	Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung.....	20
2.3	MSI-ANALYSE	20
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	20
2.3.2	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	23
2.3.3	Silberfärbung.....	25
2.3.4	Auswertung.....	26
2.4	METHYLIERUNGSANALYSEN	28
2.4.1	Grundlagen.....	28
2.4.2	Durchführung	29
2.5	HERSTELLUNG VON TISSUE-MIKRO-ARRAYS.....	32
2.5.1	Grundlagen.....	32
2.5.2	Durchführung	33
2.6	FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	34
2.6.1	Grundlagen.....	34
2.6.2	Durchführung	35
2.6.3	Auswertung.....	37

2.7	p16 ^{INK4A} -IMMUNFÄRBUNG VON TISSUE-MIKRO-ARRAYS.....	39
2.7.1	Grundlagen.....	39
2.7.2	Durchführung.....	39
2.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	EPIDEMIOLOGIE UND KLINISCH-PATHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN	42
3.1.1	Papillenkarcinome.....	42
3.1.2	Dünndarmkarcinome	44
3.2	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	46
3.2.1	UroVysion®-Färbung am TMA	46
3.2.2	Gewebsspezifische Durchschnittswerte der p16 ^{INK4a} -Signale.....	46
3.2.3	Häufigkeit von p16 ^{INK4a} -Signalverlust.....	48
3.2.4	p16 ^{INK4a} -Signalverlust und histologische Subtypen	50
3.2.5	p16 ^{INK4a} -Verlust und Überleben.....	51
3.2.6	p16 ^{INK4a} -Signalverlust und klinisch-pathologische Variablen	51
3.3	MSI-ANALYSE	53
3.3.1	Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen	53
3.3.2	Mikrosatellitenalterationen und histologische Subtypen	56
3.3.3	Mikrosatellitenalterationen und Überleben	61
3.3.4	Mikrosatellitenalterationen und klinisch-pathologische Variablen.....	63
3.3.5	p16 ^{INK4a} -Signalverlust und Mikrosatellitenalteration	65
3.4	METHYLIERUNG	70
3.4.1	Häufigkeit von Methylierung.....	70
3.4.2	Methylierungs-Status und Überleben	72
3.4.3	Methylierungs-Status und klinisch-pathologische Variablen.....	73
3.4.4	Methylierungs-Status und FISH	73
3.4.5	Methylierungs-Status und Mikrosatellitenalterationen.....	73
3.5	IMMUNHISTOLOGIE.....	76
3.5.1	p16 ^{INK4a} -Expression in Normalgewebe, Adenomen und Karcinomen.....	76
3.5.2	p16 ^{INK4a} -Expression bei Papillen- und Dünndarmkarcinomen.....	78
3.5.3	p16 ^{INK4a} -Expression und histologische Subtypen.....	80
3.5.4	p16 ^{INK4a} -Expression und Überleben.....	82
3.5.5	p16 ^{INK4a} -Expression und klinisch-pathologische Variablen.....	85
3.5.6	p16 ^{INK4a} -Expression und (epi-)genetische Alterationen	94
3.5.7	p16 ^{INK4a} -Expression und Methylierung	97
4	DISKUSSION	101
4.1	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	101
4.1.1	UroVysion®-Färbung von TMA-Schnitten	101
4.1.2	p16 ^{INK4a} -Signalverlust im Verlauf der Tumorentstehung	102
4.1.3	Definition von p16 ^{INK4a} -Signalverlust	104
4.2	MIKROSATELLITENALTERATION UND p16 ^{INK4A} -SIGNALVERLUST	106
4.2.1	Gegenüberstellung der Methoden	106
4.2.2	Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen	107
4.2.3	Vergleich der Ergebnisse von FISH und MSI-Analyse	108
4.3	METHYLIERUNG	109
4.3.1	Häufigkeit von Methylierung.....	109
4.3.2	Methylierung und genetische Alterationen.....	110

4.4	AUSWIRKUNGEN (EPI-)GENETISCHER ALTERATIONEN	111
4.4.1	<i>Histologische Subtypen</i>	111
4.4.2	<i>Klinisch-pathologische Variablen und Überleben</i>	111
4.5	IMMUNHISTOLOGIE.....	113
4.5.1	<i>Definition von Cut-offs, Scores und Indices</i>	113
4.5.2	<i>p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Überexpression im Verlauf der Tumorentstehung</i>	116
4.5.3	<i>p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Überexpression bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen</i>	118
4.5.4	<i>p16^{INK4a}-Expression und histologische Subtypen</i>	119
4.5.5	<i>p16^{INK4a}-Expression und Zellzyklusdysregulation.....</i>	119
4.5.6	<i>p16^{INK4a}-Expression und Überleben.....</i>	121
4.5.7	<i>p16^{INK4a}-Expression und klinisch-pathologische Variablen.....</i>	122
4.6	p16 ^{INK4A} -EXPRESSIONSVERLUST UND (EPI-) GENETISCHE ALTERATIONEN	124
4.6.1	<i>p16^{INK4a}-Expressions- und p16^{INK4a}-Signalverlust</i>	124
4.6.2	<i>p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Mikrosatellitenalterationen</i>	125
4.6.3	<i>p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Methylierung.....</i>	125
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	ANHANG	128
6.1	MATERIAL	128
6.1.1	<i>Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien</i>	128
6.1.2	<i>Reagenzien.....</i>	129
6.1.3	<i>Enzyme.....</i>	132
6.1.4	<i>Primer.....</i>	132
6.1.5	<i>Antikörper.....</i>	132
6.1.6	<i>Lösungen</i>	133
6.2	ROHDATENTABELLEN	142
6.2.1	<i>klinisch-pathologische Variablen.....</i>	142
6.2.2	<i>Methylierung, Mikrosatellitenanalyse, FISH</i>	147
6.2.3	<i>Immunhistologie</i>	152
6.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	158
6.4	LITERATURVERZEICHNIS	160
6.5	DANKSAGUNG	169

1 EINLEITUNG

1.1 ANATOMISCHE GRUNDLAGEN

Die Papilla vateri ist eine kleine komplex aufgebaute Struktur, die sich im Normalfall aus 4 Anteilen zusammensetzt: aus der Vereinigung des distalen **Ductus choledochus** (distal common bile duct, ampullo-biliary portion) mit dem distalen **Ductus pancreaticus** (distal main pancreatic duct, ampullo-pancreatic portion) entsteht das **ampullopankreatobiliäre Gangsegment** (common-channel), das auf der **Papilla vateri** (im engeren Sinne) in den Dünndarm mündet.¹ Zu beachten sind dabei zahlreiche anatomische Variationen, die dazu führen, dass beispielsweise das ampullopankreatobiliäre Gangsegment in bis zu 10 % der Fälle nicht ausgebildet ist.^{2, 3} Zusätzlich bestehen durch eine uneinheitlich verwendete Nomenklatur Verwechslungsmöglichkeiten mit anderen Strukturen. Im deutschen Sprachraum wird der Begriff Papilla vateri sowohl für das Organ als Ganzes als auch seine Teilstrukturen verwendet. Der im Angloamerikanischen verwendete Begriff Ampulla (vateri) ist diesbezüglich genauer, da er sich ausschließlich auf das Organ als Ganzes bezieht, kann jedoch wieder mit dem Begriff der Ampulla duodeni, einem Teilstück der Pars superior duodeni (auch Bulbus duodeni), verwechselt werden.⁴ Im folgenden Text wird die deutsche Nomenklatur verwendet. Soweit nicht anders gekennzeichnet bezieht sich der Begriff Papilla vateri dabei immer auf das gesamte Organ. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Papilla vateri und der angrenzenden Strukturen.

Histopathologisch bemerkenswert ist die Auskleidung der Papilla vateri durch zwei unterschiedliche Epitheltypen. Die Papilla vateri (im engeren Sinne) ist von intestinaler Schleimhaut, die anderen Anteile sind durch ein pankreatobiliäres Epithel ausgekleidet.¹ Ähnlich wie bei der Zervix uteri oder auch beim gastroösophagealen Übergang entsteht dabei eine epitheliale Übergangszone, die ständig wechselnden mechanischen und chemischen Reizen ausgesetzt ist.^{1, 5}

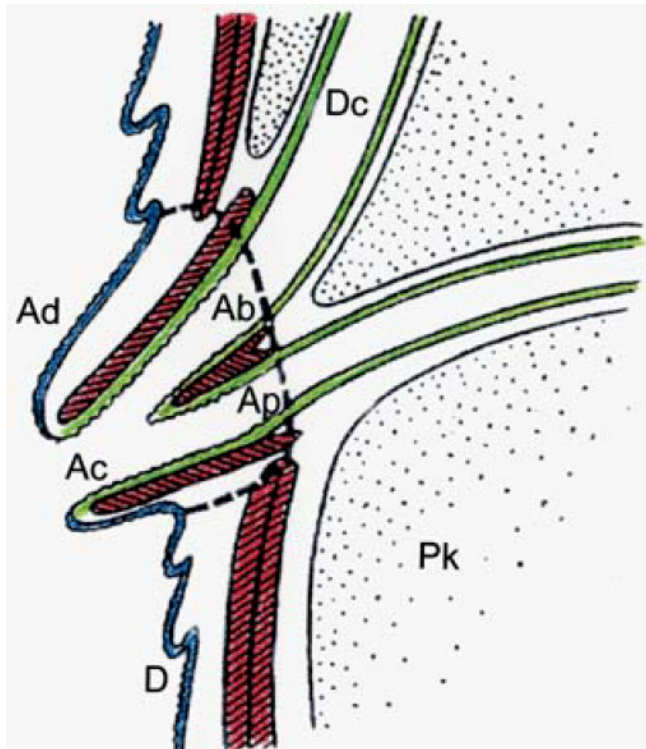


Abbildung 1: Gangabschnitte der Papilla vateri ⁵

Gangabschnitte der Papilla vateri:

Die **Papille** untergliedert sich in ein

- **ampullobiliäres Gangsegment (Ab),**
- **ampullopankreatisches Gangsegment (Ap),**
- **ampullopankreatobiliäres Gangsegment (Ac)**
- **(common channel) und das**
- **Ampullduodenum (Ad).**

Nachbarstrukturen sind

- **Ductus choledochus (Dc),**
- Pankreaskopf (Pk) und**
- **Duodenum (D)**

1.2 TUMOREN DER PAPILLA VATERI

1.2.1 Definitionen

Die geringe Größe, der komplexe Aufbau und die engen räumlichen Beziehungen der Papille zu ihren Nachbarorganen erschwert gelegentlich die Zuordnung von Tumoren zu ihren Ausgangstrukturen, da bereits sehr kleine Tumoren die Papille überwachsen können. Umgekehrt können sich auch Dünndarm-, Gallenwegs- und Pankreastumoren auf die Papilla erstrecken. In der Literatur existieren daher mehrere Begriffe für die Beschreibung von Tumoren im Bereich der Papilla vateri. Zusammen mit Tumoren des periampullären Duodenums, des distalen Ductus pancreaticus communis und des Pankreaskopfs werden Papillentumoren unter dem Begriff **periampulläre Tumoren** zusammengefasst. Einige englischsprachige Autoren verwenden den Begriff **ampullary carcinomas** zusammenfassend für Karzinome der Papilla vateri und des periampullären Duodenums. ⁶ Soweit nicht anders gekennzeichnet werden im Folgenden nur solche Tumoren als Papillentumoren bezeichnet, die ihren Ursprung im Organ der Papilla vateri selbst haben.

1.2.2 Epidemiologie

Papillentumoren sind am häufigsten epithelialer Herkunft, davon sind mehr als 90 % (prä-) maligne. Insgesamt gesehen sind **Papillenkarcinome** jedoch mit einem Anteil von 1 % aller Karzinome und 5 % der gastrointestinalen Karzinome relativ selten. Die geschätzte Lebenszeitinzidenz in der Normalbevölkerung beträgt 0,01 – 0,04 %. Bei Autopsieserien beträgt die Inzidenz 0,06 – 0,21 %. Das Alter bei Diagnosestellung liegt im Mittel bei 61,9 Jahre mit einem deutlichen Gipfel in der 8. Lebensdekade. Männer sind im Vergleich zu Frauen mit 1: 1,48 häufiger betroffen.⁶

Papillenadenome treten bei Autopsien mit einer Inzidenz von 0,04 bis 0,12 % auf. Sie machen 55 % der Adenome in der Dünndarmregion aus. Das mittlere Alter der Patienten beträgt 61 Jahre. Frauen waren mit 2,6:1 häufiger betroffen als Männer.⁶

1.2.3 Ätiologie, Risikofaktoren und assoziierte Tumoren

Der Großteil der Papillenkarcinome entwickelt sich sporadisch.⁵ Es bestehen Zusammenhänge mit chemischen Faktoren wie z.B. polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen Aminen.⁶ Als mögliche weitere Risikofaktoren werden Rauchen, die Einnahme oraler Kontrazeptiva,⁵ parasitäre Infektionen (z. B. biliäre Ascariasis oder Leberegelbefall) und Fehlbildungen (Pancreas anulare) diskutiert.^{5, 6} Eine wichtige Rolle spielen darüber hinaus genetische Erkrankungen wie Familiäre adenomatöse Polyposis Coli (FAP) und Neurofibromatose I von Recklinghausen.⁵⁻⁷

Mit Papillentumoren assoziierte Malignome sind das kolorektale Karzinom, gastrointestinale Karzinoidtumore, Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinome sowie Karzinome von Prostata und Harnblase.⁶

1.2.4 Symptome und Diagnostik

Bedingt durch die anatomischen Verhältnisse werden Papillentumore in 70-80 % der Fälle durch einen cholestatischen Ikterus auffällig. Die daraufhin meist durchgeführte endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) ermöglicht die Entnahme von Biopsien, anhand derer häufig die Diagnosestellung erfolgen kann. Sonografisch können erweiterte Gallenwege, laborchemisch Bilirubinerhöhungen, erhöhte Werte von alkalischer Phosphatase, Transaminasen und Pankreasenzymen auffallen. Zusätzlich können Symptome einer Pankreatitis sowie unspezifische Beschwerden wie Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Bauchschmerzen auftreten.^{6, 8}

1.2.5 Histopathologische Eigenschaften

Bei den prämaligen Neubildungen der Papille handelt es sich am häufigsten um Adenome vom intestinalen Typ. Sie sind in der Regel zwischen 1-3 cm groß und zeigen in den meisten Fällen ein exophytisch ins duodenale Lumen gerichtetes Wachstum. Es ist daher wichtig, sie von Dünndarmadenomen zu unterscheiden, die mit einer Inzidenz von ca. 0,1 % gehäuft (zu 55 %) in der periampullären Region auftreten. Seltener fallen Adenome nur durch Vorwölbung und Vergrößerung der Papille auf. ⁶

Mikroskopisch werden papilläre (villöse), tubulopapilläre und tubuläre Wachstumsformen unterschieden. Eine Zunahme der villösen Komponente führt zu einem gesteigerten Entartungsrisiko. Letzteres steigt auch mit zunehmendem Alter, da es hier zu einer Zunahme von höhergradigen intraepithelialen Neoplasien (high-grade / HG-IEN) kommt. ^{5,9} Papillenkarcinome werden wegen der frühzeitigen Symptombildung häufig bereits bei geringen Tumorgößen diagnostiziert. Sie sind in 75 % der Fälle unter 4 cm, in 17 % der Fälle unter 1 cm groß. Eine Einteilung nach **makroskopischen** Gesichtspunkten kann nach verschiedenen Klassifikationen vorgenommen werden. Albores-Saavedra unterscheidet **intraampulläre, periampullär duodenale, gemischt exophytische und gemischt ulzerierende Tumoren**. ⁶ Andere Autoren teilen in **intramural-protruierende, exponiert-protruierende und ulzerierende Tumoren** ein ⁵

Mikroskopisch handelt es sich bei mehr als 90 % der Papillenkarcinome um Adenokarcinome. Diese können in Form sehr vieler verschiedener histologischer Sub-Typen auftreten. Am häufigsten sind dabei der intestinale Subtyp, der den primären Dünndarm-Adenokarcinomen ähnelt, und der pankreatobiliäre Subtyp, vergleichbar primären Gallenwegs- bzw. Pankreas-Adenokarcinomen. ⁶ Eine Erklärung für die Existenz insbesondere dieser beiden Sub-Typen ist die Tumorentstehung aus den unter 1.1. bereits beschriebenen unterschiedlichen Epitheltypen der Papilla vateri. Eine möglichst präzise histologische Zuordnung zum ursprünglichen Schleimhauttyp kann insbesondere bei gering differenzierten Karzinomen durch Anwendung immunhistologischer Marker vorgenommen werden. ^{1,5} In Tabelle 1 findet sich eine Gegenüberstellung der WHO-Klassifikation und der AFIP (Armed Forces Institute of Pathology)-Klassifikation mit genauer Auflistung der verschiedenen Subtypen.

Die Union Internationale Contre le Cancre (UICC) unterscheidet die in Tabelle 2 aufgeführten TNM-Stadien. ¹⁰

Analog zu Gallenblasen- und extrahepatischen Gallengangskarzinomen werden bei der Papille hoch, mittelgradig und gering differenzierte Karzinome unterschieden.¹¹ Am häufigsten sind mittelgradig differenzierte Karzinome mit 65 %, gefolgt von 25 % gering differenzierten und 10 % gut differenzierten Karzinomen.^{6, 11}

	WHO-Klassifikation	AFIP-Klassifikation
Adenom	Tubulär Papillär Tubulopapillär Papillomatose Intraepitheliale Neoplasie (Dysplasie und Carcinoma in situ)	Tubulär Papillär Tubulopapillär Flaches Carcinoma in situ
Karzinome	Adenokarzinome Papilläres Adenokarzinom Adenokarzinom, intestinaler Typ Adenokarzinom, gastral-foveolärer Typ Muzinöses Adenokarzinom Klarzelliges Adenokarzinom Siegelringzellkarzinom Adenosquamöses Karzinom Plattenepithelkarzinom Kleinzelliges Karzinom Großzelliges Karzinom Undifferenziertes Karzinom Biliäres Zystadenokarzinom	Gewöhnliche Typen Intestinaler Typ Pankreatobiliärer Typ Ungewöhnliche Typen Papilläres Karzinom (nicht-invasiv) Invasives papilläres Karzinom Muzinöses Karzinom Siegelringzellkarzinom Klarzelliges Karzinom Adenokarzinom mit hepatoider Differenzierung Adenosquamöses Karzinom Plattenepithelkarzinom Kleinzelliges Karzinom Großzelliges neuroendokrines Karzinom Undifferenziertes Karzinom
Weitere Tumoren	Karzinoidtumor Siegelringzellkarzinom Tubuläres Karzinoid Gemischtes Karzinoid/Adenokarzinom Andere	

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Klassifikationen nach WHO und AFIP nach^{5, 6, 11}

T-Stadium	Beschreibung
TIS	Carcinoma in situ
T1	Tumor begrenzt auf die Ampulla vateri oder den Sphincter oddi
T2	Tumor infiltriert Wand des Duodenum
T3	Tumor infiltriert Pankreas
T4	Tumor infiltriert peripanreatisches Weichgewebe und/oder andere Nachbarorgane/-Strukturen
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: TNM-Stadien von Karzinomen der Ampulla vateri nach UICC ¹⁰

1.2.6 Tumorentitäten

Bei der Karzinomentstehung werden zwei Mechanismen unterschieden. Entstehen Karzinome direkt aus Normalgewebe, flachen und mikropapillären In-situ-Karzinomen oder nicht-polypösen Vorläuferläsionen, so spricht man von einer **De-novo-Karzinogenese** und bezeichnet die jeweiligen Karzinome als **De-novo-Karzinome**. Dieser Mechanismus wird häufiger bei ulzerösen und pankreatobiliären Karzinomen gefunden. ⁶

Die Entstehung von Karzinomen aus bereits vorbestehenden Adenomen wird als **Ex-Adenom-Karzinogenese** bezeichnet. Die so entstandenen **Ex-Adenom-Karzinome** enthalten dabei häufig neben dem Karzinomanteil noch Reste des Adenoms, aus dem sie entstanden sind. ⁶ Die Abfolge der Karzinomentstehung aus Adenomen wird auch als **Adenom-Karzinom-Sequenz** bezeichnet und konnte auch bei Papillenkarzinomen nachgewiesen werden. ⁹ Sporadische Papillenadenome treten mit einem mittleren Manifestationsalter von 65 Jahren auf, sporadische Papillenkarzinome etwa 8 Jahre später. ⁵ Besonders gut zur Un-

tersuchung der Adenom-Karzinom-Sequenz eignen sich Erkrankungen aus dem Kreis der sogenannten **familiären Adenomatosen**. Wichtig im Zusammenhang mit Papillentumoren ist dabei die **familiäre adenomatöse Polypose (FAP)**, die durch das gleichzeitige Auftreten von mehr als 100 kolorektalen Adenomen gekennzeichnet ist. Diese stellen **obligate Präkanzerosen** dar, d. h. Tumoren, die sich immer zu Karzinomen fortentwickeln. Ursächlich ist eine autosomal dominant vererbte Mutation im FAP-Gen auf dem Chromosom 5q.¹² Zusätzlich entstehen extrakolische Tumore, wobei Karzinome der Papilla vateri am häufigsten sind.^{5, 13, 14} Schätzungsweise 10 % der FAP-Patienten versterben an Karzinomen des oberen Gastrointestinal-Trakts, die ihren Ursprung zumeist in der periampullären Region haben.⁶ Umgekehrt sind Papillen-Adenome in bis zu 95 % der Fälle FAP-assoziiert und treten im Vergleich zu sporadischen Adenomen durchschnittlich 20 Jahre früher im Alter von 41 Jahren auf.⁵ Das Risiko für die Entstehung von Papillenkarcinomen ist mit einer Lebenszeitinzidenz von 12 Prozent um das 100- bis 200-fache höher verglichen mit der Normalbevölkerung.⁶ Bedeutsam wurde dies jedoch erst nach Senkung der Mortalität an Kolonkarzinomen durch die Einführung der prophylaktischen Kolektomie als wesentliches Element in der Therapie der FAP. Durchschnittlich 15 bis 20 Jahre später, im Alter von etwa 45-50 Jahren treten Papillenkarcinome auf. Folge ist eine deutlich erhöhte Mortalität an Papillenkarcinomen unter FAP-Patienten in den letzten Jahren.⁶

Auch bei anderen Formen hereditärer Adenomatosen, z.B. beim Krankheitsbild des **Hereditären nicht-polypösen-kolorektalen Karzinoms (HNPCC)**, besteht in einigen Fällen eine Assoziation mit Karzinomen der Papilla vateri. Diese spielen allerdings wegen der sehr viel geringeren Inzidenz klinisch eine sehr untergeordnete Rolle.^{5, 15}

1.2.7 Therapie

Seit langem anerkannter Therapiestandard bei Karzinomen der Papille ist die Pankreatoduodenektomie (nach Whipple). Neben diesem Verfahren sind bei Adenomen die chirurgische Papillektomie oder endoskopische Tumorresektionen möglich. Hierbei muss immer eine individuelle Therapie-Entscheidung zwischen geringerer Invasivität und besserer Verträglichkeit einerseits, aber höherem Rezidiv- und Entartungsrisiko andererseits getroffen werden.¹⁶⁻¹⁸ Bei nicht mehr kurativ behandelbaren Patienten können neben chirurgischer Resektion von Tumorgewebe und Bypassoperationen endoskopische Stent-Einlagen oder perkutane Ableitungen von Gallen- bzw. Pankreassekret erfolgen.¹⁹⁻²¹

1.2.8 Prognose

Wichtigster prognostischer Faktor bei Papillenkarzinomen ist die von Tumorstadium und Tumorgröße abhängige Operabilität.^{1, 5, 6} Wegen der meist frühzeitigen Symptomentwicklung (75 % der Karzinome sind unter 4 cm, 17 % unter 1 cm) können ca. 80 % der Patienten einer chirurgischen Behandlung zugeführt werden. Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt in diesem Fall im Mittel 40 % (zwischen 21 und 61 %), bei Limitierung des Tumors auf die Sphinktermuskulatur sogar 85 %.^{5, 6} Mit schlechterer Prognose sind Lymphknoten-Metastasen, vor allem solche entlang der A. mesenterica superior, ulzerierter Makrotyp, niedriger Differenzierungsgrad und Tumoren ohne Vorläuferläsionen assoziiert.^{5, 22-24} Zudem gibt es in der Literatur Hinweise auf prognostische Unterschiede im Bezug auf die verschiedenen histologischen Subtypen.^{3, 5, 6}

1.3 MOLEKULARE TUMORPATHOGENESE

Ursächlich für die Entstehung von Adenomen und Karzinomen sind genetische oder epigenetische Veränderungen, die entweder bereits als **Keimbahnmutation** vererbt oder aber im Laufe des Lebens durch eine Reihe von unterschiedlichen Mechanismen erworben sein können (**sporadische Mutationen**).²⁵ Betreffen die Veränderungen die primäre Nukleotidsequenz, so spricht man von **genetischen** Mutationsmechanismen. Eine Veränderung des Genexpression-Musters bei unveränderter primärer Nukleotidsequenz bezeichnet man als **epigenetisch**.²⁵

1.3.1 Genetische Veränderungen

Bei den genetischen Veränderungen kann eine Einteilung in drei Grundmechanismen vorgenommen werden.

Aneuploidie oder **numerische Chromosomenmutationen** beruhen auf einer veränderten Anzahl an Chromosomen. Zu unterscheiden sind dabei Verlust (**Hypoploidie**) und Hinzukommen (**Hyperploidie**) einzelner Chromosomen oder die Vervielfachung des gesamten Chromosomensatzes (**Polyloidie**).²⁶

Strukturelle Chromosomenmutationen beruhen auf Veränderungen in chromosomalen Teilbereichen. Der Verlust eines Chromosomenbereiches wird als **Deletion** bezeichnet. Im speziellen Fall der Übertragung dieses Chromosomenstückes auf ein anderes Chromosom entsteht eine **Translokation**. Weitere mögliche Veränderungen sind **Inversionen**, d.h. die

180° -Drehung eines Chromosomenteils, die Verdoppelung (**Duplikation**) oder Vervielfachung (**Amplifikation**).^{12, 26} Lichtmikroskopisch sind Deletionen oder Insertionen in Metaphasechromosomen ab Veränderungen von 4 Megabasenpaaren sichtbar, was ca. 200-500 Genen entspricht.¹² Für den Nachweis von Veränderungen kleinerer Genomabschnitte werden daher Methoden mit größerer Sensitivität benötigt, z.B. die **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**, **Mikrosatelliteninstabilitäts-Analyse (MSI-Analyse)** oder **Gensequenzierungen**.²⁷

Betreffen die Veränderungen nur extrem kleine Teilbereiche eines Chromosoms, d. h. sind nur einzelne Basenpaare verändert, so spricht man von **Genmutationen**.

Die Basensequenz ist durch den Verlust (**Deletion**), Einschub (**Insertion**) oder Austausch (**Punktmutation**) von einzelnen Basen verändert. Je nach Funktion des betroffenen Genomabschnittes ergeben sich daraus unterschiedliche Konsequenzen.

Veränderungen im Exon eines Gens führen bei Basenaustausch zu keinen Veränderungen (**Sense-Mutationen**), zur Kodierung falscher Aminosäuren (**Missense-Mutationen**) oder durch Deletion bzw. Insertion zu **Frame-Shift-Mutationen** des Leserasters, die starke Veränderungen des kodierten Proteins bewirken. Ist das Stop-Kodon betroffen, so entsteht ein längeres Genprodukt (**Nonsense-Mutation**).^{12, 26} Umgekehrt können auch innerhalb des Proteins Stop-Kodons neu entstehen, die zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese und somit zu meist stark veränderten Proteinen führen. Der direkte Nachweis von Genmutationen erfolgt mittels der Technik der Gensequenzierung.

1.3.2 Epigenetische Veränderungen

Der genetische Code der DNA ist durch die 4 Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin festgelegt. Durch kovalente Modifikationen können nach der DNA-Replikation weitere Basen entstehen, z.B. durch Übertragung von Methylgruppen von S-Adenosyl-Methionin auf die Base Cytosin mittels **DNA-Methyltransferasen (DNMT)**. Möglich ist dies allerdings nur, wenn Cytosin in einem sogenannten **CpG-Dinukleotid (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)**, d. h. von einem Guanidin gefolgt, vorliegt.²⁵ CpG-Nukleotide kommen gehäuft in kleinen DNA-Abschnitten vor, den sogenannten **CpG-Inseln**, die wiederum häufig in Promotorregionen liegen. Umgekehrt weist ca. die Hälfte der Promotorregionen im menschlichen Genom CpG-Inseln auf.²⁵ Eine Methylierung von Promotorregionen führt zum „Abschalten“ des Gens (**gene-silencing**),^{25, 28, 29} da CpG-Inseln hier meist in ihrer unmethylierten Form vorliegen.²⁵ Im Gegensatz dazu sind außerhalb der CPG-Inseln liegende CpGs meist stark methyliert. Es handelt sich hierbei häufig um nicht-kodierende

DNA-Abschnitte. Eine wesentliche Bedeutung der Methylierung scheint in der Verhinderung der Expression von repetitiven Sequenzen zu liegen, die schädliche virale DNA enthalten können.²⁵ Als Ausnahme gehören einige wenige voll methylierten CpG-Inseln zu sogenannten „**imprinted-Genes**“, beispielsweise auf dem zweiten X-Chromosom von Frauen liegende inaktivierte Gene.^{25, 30} Tumorzellen zeichnen sich hinsichtlich der Methylierungsmuster durch ein im Vergleich zur normalen Zelle inverses Verhältnis aus: Die Methylierungsdichte von Regionen mit ursprünglich hoher Dichte ist herabgesetzt^{25, 31, 32} und CpG-Inseln in Promotorregionen weisen eine verstärkte Methylierung auf.²⁵ In der Konsequenz werden normalerweise abgeschaltete Gene exprimiert,^{25, 33} und aufgrund einer verminderten Methylierung in perizentromeren Regionen ist die chromosomale Stabilität vermindert.^{25, 34, 35} Zudem werden durch Methylierung von Promotorregionen ursprünglich aktive Gene wie z.B. Tumorsuppressorgene abgeschaltet.²⁵

Neben der Methylierung von Promotorregionen können epigenetische Veränderungen auch durch Veränderungen (z.B. Acetylierungen) an Proteinstrukturen (z.B. Histonen) verursacht werden.^{25, 28-30, 36, 37}

1.3.3 Zellzyklus und Signaltransduktion

Tumorentstehung ist nur eine von vielen möglichen Konsequenzen nach genetischen oder epigenetischen Veränderungen im Zellgenom, da die Entartung von Zellen eine Beeinflussung von Mechanismen der Kontrolle von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod voraussetzt. Unter physiologischen Bedingungen wird Zellwachstum häufig durch Bindung von Wachstumsfaktoren an membranständige Rezeptoren vermittelt. Durch Aktivierung von Signaltransduktionsproteinen an der inneren Seite der Zellmembran wird das Signal über Signalübertragungssysteme zum Zellkern weitergegeben. Dort befinden sich nukleäre Faktoren, die die DNA-Transkription regeln und somit über Eintritt oder Verbleib der Zelle in einer bestimmte Phase des Zellzyklus bestimmen.³ Diese Vorgänge werden über drei Proteinklassen vermittelt: **Zykline**, **Zyklinabhängige Kinasen (CDK)** und **CDK-Inhibitoren (CKI)**. CDKs bilden Komplexe mit den Zyklinen und bewirken durch Phosphorylierung von Zielproteinen eine Progression im Zellzyklus. Eine Kontrolle dieser Vorgänge findet durch die CKI statt.³ Betreffen Mutationen eines der direkt oder indirekt am Zellzyklus beteiligten Proteine bzw. Gene, so führen Veränderungen der Zelleigenschaften schließlich zur Entstehung von Tumoren.³ Je nach Funktion werden Onkogene, Tumorsuppressorgene, Apoptosegene, Telomerasegene und DNA-Reparaturgene unterschieden.¹²

1.3.4 Onkogene und Protoonkogene

Bei **Onkogenen** handelt es sich um Gene, die Proliferation, Mobilität und Differenzierung von Zellen regulieren. Veränderungen führen über Fehlregulation und strukturelle Veränderungen zu unkontrollierten Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Zur Gruppe der Onkogene gehören Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Faktoren der intrazellulären Signaltransduktion, nukleäre Transkriptionsfaktoren, Zykline und zyklinabhängige Kinasen. Nach ihrer Herkunft werden **virale Onkogene**, d. h. durch Integration von retroviraler DNA ins zelluläre Genom entstandene Onkogene, von **zellulären Onkogenen** unterschieden.¹² Mutationen von Onkogenen haben einen **dominanten Effekt**, da die Alteration eines einzigen der beiden Allele für die Zelltransformation ausreichend ist.¹²

Protoonkogene entstehen, wenn durch Mutationen eines Gens **konstitutiv aktive Genprodukte** entstehen, d. h. im Falle eines Wachstumsfaktoren-Rezeptors wird zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade keine Bindung des Wachstumsfaktors mehr benötigt.¹²

1.3.5 Tumorsuppressorgene

Bei **Tumorsuppressorgenen** hingegen handelt es sich um zelluläre Gene, deren Genprodukte eine wachstumsunterdrückende Funktion besitzen. In der Folge kommt es bei Verlust zur Deregulation des Zellwachstums. Im Gegensatz zu Veränderungen bei Onkogenen ist bei Tumorsuppressorgenen der Verlust beider Allele nötig. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem **rezessiven Genverhalten**¹² und von „**loss of function**“. Tumorsuppressorgene werden daher auch als Gegenstücke der Onkogene bezeichnet.²⁷ Ursachen für den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen sind Deletionen oder Mutationen im Gen selbst oder in Regulatorsequenzen, die entweder zum Expressionsverlust, zu einer gestörten physiologischen Interaktion oder im Sonderfall zu einer pathologischen Assoziation des mutierten Genproduktes mit dem Normalprodukt des zweiten Allels führen (**dominant negativer Effekt**).²⁷

Eine modellhafte Beschreibung der Ereignisse, die zum Ausfall eines Tumorsuppressorgens führen, liefert das **Modell von Knudson**. Unterschieden wird zwischen *familiär bedingten Tumoren*, bei denen das erste Allel bereits zu einem früheren Zeitpunkt durch eine Keimbahnmutation inaktiviert wurde (**first hit**). Das zweite geht anschließend durch somatische Mutation verloren (**second hit**). Dieser Vorgang wird als **Loss of Heterozygosity (LOH)** bezeichnet. Bei *nicht-familiärer Tumorgenese* muss es sowohl zum Ausfall des ersten (**first**

hit) als auch des zweiten Allels (**second hit**) durch somatische Mutation kommen, um die Voraussetzung für die maligne Transformation zu schaffen.^{25, 38} Der Verlust beider Allele durch Punktmutationen ist dabei relativ selten. Häufig wird eine Kombination unterschiedlicher Mechanismen beobachtet, z.B. die Kombination von Promotormethylierung und Punktmutation.²⁵ Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist folglich ein komplexer Vorgang, der in unterschiedlichen Schritten verlaufend sowohl genetische als auch epigenetische Mechanismen miteinander kombinieren kann. Bei der Erforschung von Ursachen für Geninaktivierungen ist daher eine Kombination unterschiedlicher Analysemethoden notwendig. Beispielsweise können dabei MSI-Analyse, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Gensequenzierungen auf genetischer mit Methylierungsanalysen auf epigenetischer Ebene kombiniert werden. Zusätzlich ist die Untersuchung der Proteinexpression durch Immunhistologie möglich.

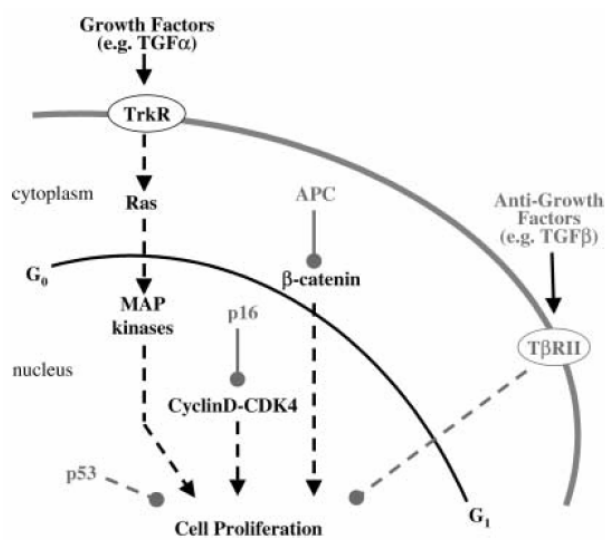
Für den Begriff LOH existieren zusätzlich zur ursprünglichen Definition im Modell von Knudson noch weitere für diese Arbeit wichtige Definitionen. Nach *Tischfield*³⁹ bedeutet LOH eine **allelische Inbalance** im weitesten Sinne. Das zunächst noch balancierte erste Allel kann nach dem Verlust des zweiten nicht mehr ausgeglichen werden. LOH in diesem Sinne umfasst daher alle Mechanismen, die zu einem Funktionsverlustes des zweiten Allels führen können. Es sind dies Deletion, Punktmutation, mitotische Rekombination, nichtdisjunktionaler Chromosomenverlust auf genetischer und Methylierungen auf epigenetischer Ebene. Der Verlust des zweiten Allels bei bereits deletiertem ersten Allel wird auch als **homozygote Deletion** bezeichnet. Im Zusammenhang mit der unter 2.3 genauer erläuterten Technik der *MSI-Analyse* können unter dem Begriff LOH nur Deletionen, Verlust ganzer Chromosomen und mitotische Rekombination subsummiert werden, da andere Mechanismen bei dieser Technik nicht erfasst werden können.

Eine Ausnahme des **Two-Hit-Modells nach Knudson** bildet die sogenannte **Haploinsuffizienz**. Sie besagt, dass in manchen Fällen bereits der Verlust eines der beiden Allele dazu ausreicht, die Genexpression unter eine kritische Schwelle abzusenken und folglich die Funktion von Tumorsuppressorgenen zu beeinträchtigen.^{27, 40, 41}

1.3.6 Genveränderungen bei Papillentumoren

Für die Entstehung von Papillenkarcinomen konnten bisher Veränderungen in mehreren Genen nachgewiesen werden. Häufige Veränderungen betreffen dabei die Gene **k-ras**^{5, 42-46} **p53**^{5, 45, 47-49} und **APC** (Adenomatous Polyposis Coli).^{5, 44, 50} Weiterhin werden Alterationen von **TGF- β 2** (Transforming Growth-Factor-beta-Receptor 2)^{3, 51} **TGF-alpha** (Transforming Growth-Factor-alpha)^{3, 52} und **TGF-beta** (Transforming Growth-Factor-beta)^{3, 53} berichtet.

K-ras gehört zu Signaltransduktoren, die direkt in die Zellzyklus-Regulation eingreifen, indem sie über eine Kontrolle der CDKs das Fortschreiten im Zellzyklus verhindern können.^{3, 54} K-Ras-Mutationen finden sich bei Papillenadenomen^{3, 42, 43, 55-57} und bei 13 - 50 % der Papillenkarcinome.^{3, 42, 43, 55-60} **P53** ist ein Tumorsuppressorgen, das bei Zellschäden zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führt.^{3, 61, 62} Bei Papillenkarcinomen finden sich Alterationen in ca. 60 % der Fälle.^{3, 44, 47, 50, 63} Bei **APC** handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, dessen Ausfall über eine Verschiebung von β -catenin zu Zellwachstum und maligner Transformation führt.^{3, 64-70} Mutationen werden bei einem Großteil der FAP-assoziierten und in unterschiedlicher Häufigkeit bei sporadischen Papillenkarcinomen gefunden.^{3, 5, 6, 44, 50, 71} Die Rolle des **p16^{INK4a}**-Tumorsuppressorgens, das ebenfalls eine wichtige Rolle im Rahmen der Entstehung von Papillentumoren der Papilla vateri spielt, wird gesondert in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt. Abbildung 2 zeigt ein stark vereinfachtes Schema einiger an der Zellzyklusregulation von Papillentumoren beteiligter Gene.



TrkR: Thyrosinkinase-Rezeptor
APC: Adenomatous Polyposis coli
CDK4: cyclin-dependent kinase 4
Pfeile: Aktivierung
Striche mit Punkt: Inhibierung
gestrichelte Pfeile oder Striche: indirekter Signaltransduktionsweg
TGFβ: transforming growth factor β
MAP mitogen-activated protein

Abbildung 2: vereinfachtes Schema über einige an der Zellzyklus-Regulation von Papillenkarcinomen beteiligten Gene³

1.4 DAS P16^{INK4A} - TUMORSUPPRESSORGEN

Das p16^{INK4a}- Gen ist eines der in menschlichen Neoplasien am häufigsten von Inaktivierungen betroffenen Gene.⁷² In der Literatur finden sich auch die folgenden Bezeichnungen: p16, p16^{INK4a}, INK 4a, CDKN2 oder MTS1. Das p16^{INK4a}- Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 9, der den für die Tumorentstehung wichtigen CDKN2A-Genort auf 9p21 enthält.^{73, 74} Seine Besonderheit besteht darin, dass er zwei strukturell verschiedene Proteine codiert, das p16^{INK4a} (INK4a) und p14^{ARF}.⁷⁵ Die beiden Proteine entstehen durch alternatives Spleißen von mRNA, wobei für p16^{INK4a} die Exone 1a, 2 und 3, für p14^{ARF} ein alternatives Exon 1 sowie die Exone 2 und 3 in einem anderen Leserahmen verwendet werden.⁷⁶ Die Expression der Gene steht je unter der Kontrolle eines eigenen Regulatorgens.⁷⁵

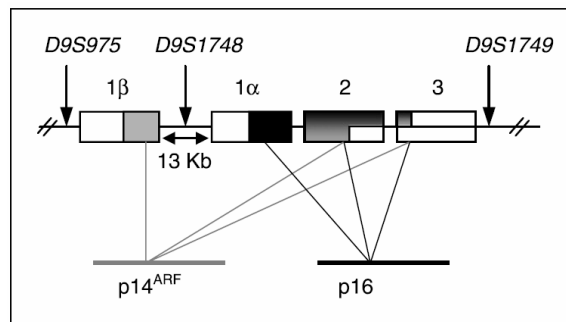


Abbildung 3: Genlokus für p16^{INK4a} und p14⁷⁵

1.4.1 Funktion

P16^{INK4a} ist ein Mitglied der **CDK-Inhibitoren Familie**.^{27, 73, 77} Durch Inhibition der Phosphorylierung von **pRb-aktivierten zyklinabhängige Kinasen** CDK 4 und 6 fungiert es als Agonist des **Retinoblastom-Proteins (pRb)**⁷² und negativer Regulator des **pRb/E2F-Signaltransduktionswegs**, der ein wesentliches Element des sogenannten **G1/S-Transition-Checkpoint** im Zellzyklus darstellt.^{78, 79} In Abwesenheit von p16^{INK4a} wird der Eintritt der Zelle in die S-Phase stimuliert mit resultierender beschleunigter Zellzyklus-Progression und vermehrter Zell-Proliferation.^{76, 80}

Eine weitere wichtige Rolle spielt p16^{INK4a} im Rahmen der **Seneszenz** von Zellen. Hierbei handelt es sich um einen Zustand, der durch das Aufrechterhalten von relativ intakten Zellstrukturen gekennzeichnet ist, obwohl gleichzeitig eine Vielzahl struktureller Veränderungen wie z.B. verminderte Zelladhäsion und eine starke Veränderung der Chromatinstruktur

vorliegen. Man geht davon aus, dass dieser Zustand, im Gegensatz zur Apoptose, dazu dient, Gewebsstrukturen aufrecht zu erhalten.⁸¹ Bewirkt wird dies durch eine extrem starke Form des Zellzyklus-Arrests in der G1-Phase, der die Zelle vor versehentlicher onkogenetischer Aktivierung schützt.⁸² Eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Seneszenz spielen auch der **pRb-** und **p53-Signaltransduktionsweg**.^{82, 83}

Nach Einwirkung schädigender Faktoren wird vermehrt p16^{INK4a} (oder p53) gebildet, was wiederum das Rb-Protein aktiviert und letztlich das Anbinden des Wachstumsfaktors E2F an seine Rezeptoren verhindert.⁸¹ Die Forschung an Urothelzellen lieferte Hinweise auf zusätzliche Funktionen von p16^{INK4a} bei der Modulation von zellkontakt-unabhängigen Wachstum,^{75, 84} Anoikis,^{75, 85} Angiogenese^{75, 86} und Tumorzellinvasion.^{75, 87}

1.4.2 Inaktivierung

p16^{INK4a} wird in vielen menschlichen Tumoren inaktiviert.^{80, 88-90} Dies geschieht im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorsuppressorgenen nicht in erster Linie durch Punktmutationen, sondern⁷⁸ durch für die unterschiedlichen untersuchten Malignome jeweils relativ gewebespezifische eigene Inaktivierungsmuster. Neben genetischen Alterationen wie homozygoten oder heterozygoten Deletionen und (Punkt)Mutationen kodierender oder angrenzender nicht-kodierender Bereiche werden Hypermethylierungen des p16^{INK4a}-Promotors beschrieben.^{76-78, 80, 88, 89, 91}

Als Hauptursachen für p16^{INK4a}-Inaktivierungen werden homozygote Deletionen^{74, 78} und CpG-Insel-Hypermethylierung in 5'-Promotorregionen gefunden.^{77, 78, 92-95} Punktmutationen und kleine Deletionen oder Insertionen kommen bei Melanomen^{78, 96} oder Pankreastumoren vor, sind ansonsten jedoch relativ selten.^{78, 97} Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und dem duktalem Pankreaskarzinom spielt LOH^{98, 99} die wichtigste Rolle.

Das Plattenepithelkarzinom der Blase zeigt p16^{INK4a}-Deletionen, jedoch keine Promotormethylierungen. Kolonkarzinom, Zervixkarzinom und Gastrinom haben häufige Promotormethylierungen, hingegen keine Genmutationen⁹⁹⁻¹⁰². Im Gegensatz dazu sind Methylierungen bei Endometriumkarzinomen sehr selten¹⁰³. Gastrointestinale Stromatumoren zeigen Promotormethylierungen, LOH und Mutationen zu ungefähr gleichen Teilen.⁹⁹ An der Inaktivierung von p16^{INK4a} bei Tumoren der periampullären Region sind am häufigsten Deletionen und Hypermethylierung, seltener Punktmutationen beteiligt.^{5, 76, 78, 104}

1.4.3 Bedeutung

Bei einigen Tumorarten führt p16^{INK4a}-Verlust nachweislich zur Verschlechterung der Prognose, z.B. bei kolorektalem Karzinom,^{77, 99, 105-107} Leiomyosarkom^{105, 108}, Nichtkleinzelligem Lungenkrebs^{99, 105, 109, 110}, niedriggradigem Astrozytom^{105, 111}, Nasopharynx-Karzinom^{105, 112}, Endometriumkarzinom^{77, 103, 113}, gastrointestinalen Stromatumoren^{105 99} und primärem Neuroblastom.^{77, 114} Die Untersuchung des p16^{INK4a}-Status von periampullären Tumoren in Bezug auf Prognose und klinisch-pathologische Variablen lieferte bisher keine eindeutigen Ergebnisse.^{76, 77, 115}

1.4.4 periampulläre Karzinome

P16^{INK4a}-Alterationen sind ein häufiges Ereignis bei Tumoren der extra-und intrahepatischen Gallenwege inklusive Gallenblase, der Papilla vateri^{76-78, 115-117} und des Dünndarms.¹¹⁸ Die zur Untersuchung des p16^{INK4a}-Status verwendeten Methoden sind Methylierungsanalysen^{76-78, 118-120}, MSI-Analysen^{76, 78}, Gensequenzierungen^{76, 78} und immunhistochemische Untersuchung der Genexpression^{77, 115, 117}. Bisher kaum verwendet wurde die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.¹¹⁷ An der Inaktivierung von p16^{INK4a} bei Tumoren der periampullären Region sind am häufigsten Deletionen und Hypermethylierung, seltener Punktmutationen beteiligt.^{76, 78, 104} Die Inaktivierung beider Allele erfolgt durch Kombination von LOH und Hypermethylierung.⁷⁸ Der Zusammenhang zwischen Methylierung und Geninaktivierung konnte in Zellkulturen durch Wiederherstellung der Genexpression infolge Demethylierung untermauert werden.⁷⁸

Es wird angenommen, dass die Inaktivierung von p16^{INK4a} einen frühen Schritt bei der Entstehung von Adenokarzinomen darstellt, da sich bereits bei pankreatischen intraepithelialen Neoplasien mit Zunahme der intraepithelialen Neoplasien von low-Grade zu high-Grade intraepithelialen Neoplasien / Dysplasien eine abnehmende p16^{INK4a}-Expression zeigte.^{121,}

1.5 ZIEL DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, weitere Kenntnisse über die genetischen und epigenetischen Mechanismen der Tumorentstehung von Adenokarzinomen der Papilla vateri zu gewinnen, die aufgrund ihrer Lokalisation an der Schnittstelle zwischen Dünndarm und extrahepatischen Gallenwegen mit unterschiedlichen Epitheltypen eine Sonderstellung einnehmen. Dabei wurde die weltweit größte Serie von Papillenkarcinomen mit bekanntem klinischen Verlauf untersucht. Es sollte die Häufigkeit der verschiedenen genetischen und epigenetischen Alterationen des p16^{INK4a}-Tumorsuppressorgens mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, MSI-Analyse, Methylierungsanalyse und Immunhistochemie bestimmt werden. Erstmalig wurde dabei der ursprünglich für Harnblasen-Zytologien entwickelte UroVysion[®]-Kit (Abbot, Les Plaines, USA) für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Tissue-Micro-Array-Gewebeschnitten mit Papillen- und Dünndarm-Tumoren erprobt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 HERKUNFT DER GEWEBEPROBEN

Da Tumoren der Papilla vateri relativ selten vorkommen, wurde das Ausgangsmaterial aus dem Tumorarchiv des pathologischen Instituts der Universität Regensburg und weiteren 5 pathologischen Instituten in Deutschland, der Schweiz und Italien zusammengestellt. Insgesamt konnten 31 Adenome und 170 Karzinome mit sicherer Herkunft aus den die Papilla vateri bildenden Strukturen gesammelt werden. Ein Großteil davon entstammte Operationspräparaten von Whipple-Operationen (n=161) und transduodenalen Lokalresektionen (n=26). In geringerem Umfang wurden Proben durch endoskopische Resektionen (n=13) und Biopsien (n=1) gewonnen. Die Tumoren stammten aus den Jahren 1985 bis 2005. Zusätzlich wurden 32 Dünndarmtumoren aus den Jahren 1985 bis 2003 untersucht.

2.2 GRUNDLEGENDE ARBEITEN

2.2.1 Formalinfixierung und Archivierung von Gewebeproben

Am pathologischen Institut der Universität Regensburg werden die eingesandten OP-Präparate nach dem Zuschnitt für einige Stunden in 4%iger Formalinlösung fixiert, zugeschnitten und in Paraffin eingebettet. Um eine Eignung der Gewebeproben auch für die DNA-Gewinnung zu gewährleisten, müssen an die Formalinfixierung besondere Anforderungen gestellt werden. Einen entscheidenden Faktor stellt dabei die Fixationsdauer dar, da der Erfolg der PCR-Untersuchungen mit zunehmenden Fixationszeiten, insbesondere solchen über 24 Stunden, stark abnimmt.¹²³

2.2.2 Herstellung von Gewebeschnitten und Entparaffinierung

Von jedem Gewebeblock werden 4 Schnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm für die Mikrodisektion und 1 Schnitt mit 2 µm für die HE-Färbung hergestellt, die nach Einbringen in ein 35 °C warmes Wasserbad auf zuvor mit Alkohol gereinigte, mit der Nummer des Paraffinblockes beschriftete Objektträger aufgezogen werden. Die Trocknung erfolgt bei 45 °C im Brutschrank. Anschließend Inkubation der Paraffin-Schnitte für 30 Minuten bei 72 °C im Brutschrank, wodurch das Paraffin schmilzt und abläuft. Danach müssen die Schnitte noch ein Xylolbad (2-5 min) und eine absteigende Alkoholreihe (je 1-2 min) durchlaufen,

bevor sie entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zu einer Woche in 70 %igem Alkohol aufbewahrt werden können.

2.2.3 Hämatoxin-Eosin- (HE) Färbung

Als Referenz für die Mikrodisektion dient der HE-gefärbte 2 µm dicke Gewebeschnitt. Er durchläuft im Einzelnen folgende Schritte:

Schritt	Vorgang
1	10 min Xylol
2	1 bis 2 min absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 60 %)
3	1 min in dest. Wasser
4	10 min in Hämatoxylin
5	Bläuen in warmen Leitungswasser über 25 min
6	wenige Sekunden in Eosin
7	Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x)
8	Aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 80 %, 96 %, 100 %)
9	Xylol
10	Eindeckeln mit Entellan [®] und Deckglas

Tabelle 3: Durchführung der HE-Färbung

2.2.4 Mikrodisektion

Das Prinzip der Mikrodisektion besteht darin, auf einem histologischen Schnitt unter dem Mikroskop selektiv bestimmte Gewebebezirke zu isolieren.¹²⁴ Zuerst wird auf dem HE-Schnitt das Tumoreal bzw. das Normalgewebe aufgesucht und die Lage mit einem Foliestift markiert. Am Methylenblau gefärbten, mit entionisiertem Wasser angefeuchteten 10-µm-Gewebsschnitt wird unter dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung mit einer sterilen Kanüle zunächst vorsichtig das Normalgewebe disseziert. In einem zweiten Schritt wird nach erneutem Anfeuchten mit einer neuen Kanüle das Tumorgewebe selektiv abgekratzt und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, in das zuvor 180 µl Verdaupuffer (ATL-

Puffer, Teil des QIAamp DNA Mini Kits) gegeben wurde. Ziel der Mikrodissektion war, 70 bis 80 % Tumorzellen zu erhalten.

2.2.5 Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung

Erst vollständig von nukleären und zytoplasmatischen Proteinverunreinigungen (z.B. DNA-sen, Histone) gereinigte DNA ist zur Amplifikation mittels PCR geeignet. Eine schnelle und effektive Reinigung ist durch die Verwendung kommerzieller Kits, z.B. des QiAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) möglich. Die Isolation erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgt eine zweimalige Eluation mit jeweils 100 µl destilliertem Wasser. Die Säulen werden dazu zweimal auf einen auf 70 °C vorgeheizten Thermoblock gestellt, mit 100 µl 70 °C warmen Aqua dest. versetzt und schließlich 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Gesamtvolumen wird mittels einer „SpeedVac“-Vacuumzentrifuge (Savant, Farmingdale, USA) auf 50 µl reduziert. Die dabei erhöhte DNA-Konzentration misst man mit einem Spektralphotometer (Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Die in Wasser gelöste DNA kann bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

2.3 MSI-ANALYSE

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

2.3.1.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht theoretisch die unendliche Vervielfältigung eines einzigen DNA-Moleküls in vitro. Voraussetzung dazu ist die Kenntnis der Sequenzen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren.

An der Reaktion sind im Wesentlichen ein Primerpaar, das jeweils an das 3'-Ende des Matrixstranges bindet, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase beteiligt. Ein Einzelzyklus der PCR besteht aus folgenden Schritten: **Denaturierung** der Doppelstrang-DNA in die 2 Einzelstränge durch Erhitzen auf 94 °C für 1 min, **Hybridisierung** der Primer (die sog. Annealing-Temperatur ist primerabhängig und beträgt meist zwischen 50 – 70 °C) und **Elongation** (DNA-Synthese durch Verlängerung der Primer durch Anbau von Nukleotiden an das freie 3'-OH-Ende; erfolgt bei 72 °C, da hier die Taq-Polymerase ihr Temperaturoptimum besitzt).

Eine der vielen Anwendungsmöglichkeiten der PCR besteht in der Amplifikation von Mikrosatelliten. Es handelt sich dabei um DNA-Sequenzen, die bestimmte Mono-, Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Motive in vielfacher Wiederholung enthalten. Interindividuell besteht ein ausgeprägter Polymorphismus, der dazu führt, dass in einer Population viele unterschiedlich lange Allele existieren und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür besteht, am zu untersuchenden Genort eine heterozygote Konstellation vorzufinden. Diese ist eine wesentliche Voraussetzung für die Feststellung von Allelverlust in einer Tumorgewebeprobe verglichen mit der Normalgewebeprobe.

Da es sich bei den Mikrosatelliten um sogenannte nicht-kodierende Sequenzen handelt, hat ein Allelverlust zunächst keine direkten negativen Konsequenzen für die betroffenen Zellen. Allerdings weist ein nachgewiesener Allelverlust auf mögliche Deletionen in den angrenzenden kodierenden Bereichen hin. Durch die Kombination von mehreren Primern für unterschiedliche Gen-Loci können somit Rückschlüsse auf den Verlust dazwischenliegender Tumor-Suppressor-Gen-Loci bzw. größerer Chromosomenbereiche, wie z.B. ganzer Chromosomenarme, gezogen werden.

Die für die LOH-Untersuchungen des p16^{INK4a}-Tumorsuppressorgens verwendeten Mikrosatellitenmarker liegen alle auf dem Chromosom 9p21. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer.

Primer	Annealing-Temperatur
D9S 1751 (pky 11)	55 °C
D9S 304	60 °C

Tabelle 4: bei der MSI-Analyse verwendete Primer

2.3.1.2 Durchführung

Die Reagenzien für den PCR-Ansatz werden auf Eis pipettiert, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden und die Haltbarkeit der Substanzen zu erhöhen.

Reagenz		Volumen in µl
Master-Mix	Aqua dest.	19,5
	Reaktions-Puffer	2,5
	dNTPs	0,5
	Primer	0,3
	Taq-Polymerase	0,2
DNA		2,0
Summe		25,0

Tabelle 5: PCR-Ansatz bezogen auf 25 µl

Vom Mastermix (Tabelle 5) werden jeweils 23 µl auf Eppendorf-Cups verteilt, kurz zentrifugiert und 2 µl Proben-DNA hinzugegeben. Als Positivkontrolle werden 2 µl Plazenta-DNA, als Negativkontrolle 2 µl H₂O zum Mastermix gegeben. Die Cups werden auf dem Reaktionsgefäßschüttler (Vortex) gemischt und dann für 10 Sekunden zentrifugiert. Das PCR-Gerät wird wie in Tabelle 6 beschrieben programmiert.

Schritt	Operation
1	94 °C, 2 min
2	1 °C/s auf 94 °C
3	94 °C, 1 min
4	1 °C/s auf AT
5	AT, 1 min
6	1 °C/s auf 72 °C
7	72 °C, 1 min
8	gehe zu 2, 34 x
9	72 °C, 8 min
10	4 °C

Tabelle 6: Programmierung des PCR-Geräts (AT: primerspezifische Annealing-Temperatur)

2.3.1.3 Sicherheitsmaßnahmen

Für eine erfolgreiche Durchführung der PCR ist wegen der hohen Sensitivität der Methode eine Reihe an Vorkehrungen und Maßnahmen notwendig wie z.B. die Trennung der Arbeitsbereiche in sog. Prä- und Post-PCR-Räume, die Verwendung von Einmalhandschuhen, sterilen Pipettenspitzen und autoklavierten Cups, häufiger Wechsel von Reaktionslösungen sowie vorsichtige Handhabung und korrekte Lagerung der Cups mit den DNA-Proben. Um Kontaminationen sichtbar zu machen, wird für jede PCR eine Negativkontrolle mit Aqua dest. anstatt DNA mitgeführt.

Auch bei Beachten aller Anweisungen muss sich der Erfolg einer PCR nicht immer einstellen. Die Ursachen sind vielfältig, häufig ist jedoch die Proben-DNA als Fehlerquelle auszumachen. Eine DNA-Degradation hängt u.a. ab von der Formalin-Fixationszeit, der pH-neutralen Pufferung des verwendeten Formalins, dem Lagerungs-Alter der Paraffinblöcke und wirkt sich mit zunehmender Länge der zu amplifizierenden Sequenzen in stärkerem Maße aus.¹²³ Zusätzlich vermindert sich die DNA-Qualität durch lange Lagerungszeit der isolierten DNA sowie durch häufigen Temperaturwechsel beim Herausnehmen aus dem Kühlschrank. Außerdem können trotz Reinigung der DNA PCR-Inhibitoren vorhanden sein, die die PCR-Ausbeute vermindern. Auch die anderen an der PCR beteiligten Reagenzien sollten regelmäßig ausgetauscht werden, um nicht durch Verunreinigungen das Ergebnis der PCR negativ zu beeinflussen.

2.3.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

2.3.2.1 Grundlagen

Im Anschluss an die PCR-Reaktion werden die erhaltenen Amplifikate in einem 6,7 %igen Polyacrylamid-Urea-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine hohe Trennschärfe der einzelnen Fragmente, deren Länge ca. 60 bis 400 Basenpaare beträgt.¹²⁵ In Anwesenheit von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethyldiamin) findet eine Polymerisation des Monomers Acrylamid zu Ketten statt, die zusätzlich mit Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Durch Anlegen einer Spannung wandern die DNA-Fragmente durch die Poren des Gels. Die dabei pro Zeit zurückgelegte Strecke ist umso größer, je kleiner die DNA-Moleküle sind und je größer die vom Acrylamidgehalt abhängige Porengröße ist. Zusätzlich spielt auch die Ladung der DNA-Moleküle eine Rolle.

2.3.2.2 Durchführung

Vorbereitung der Elektrophoresekammer und Herstellung der Gele

Vor der Durchführung der Elektrophorese werden Gelkammer, Glasplatte und Spacer mit einem Detergens von anhaftendem Schmutz gereinigt, mit 70 % Ethanol entfettet und die Glasplatten unter dem Abzug mit 1,5 ml silikonähnlichem Sigmacote® (Sigma, München) überschichtet (silanisiert). Letzteres gewährt später eine gute Ablösung des Gels von den Glasplatten. Nach Eintrocknen des Sigmacote® wird die 30x38 cm große Gelapparatur entsprechend der Hersteller-Angaben zusammengebaut.

Die Herstellung der Gellösung erfolgt in einem 80-ml-Gefäß durch Vermischen von 80 ml 6,7 %igem PAA (Polyacrylamid) mit 1 ml APS und 100 µl TEMED. Die Lösung wird auf eine Spritze mit Gummischlauch aufgezogen und über einen Adapter in den durch die Spacer erzeugten 0,4 mm breiten Spalt zwischen Gelkammer und Glasplatte gegossen. Am Oberrand der Gelkammer steckt man einen Plastikkamm mit 44 Zähnen als Platzhalter für die Ladetaschen zwischen die Glasplatten. Um eine vorzeitige Polymerisation in der Spritze zu vermeiden, werden die Reagenzien erst kurz vor der Reaktion aus dem Kühlschrank genommen. Nach vollständiger Auspolymerisation (Dauer mindestens 60 Minuten) kann das Gel für die Elektrophorese verwendet werden. Hierzu spannt man die Kammer mit dem fertigen PAA-Gel in die Elektrophoreseapparatur, befüllt diese mit 1 Liter TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Laufpuffer, entfernt vorsichtig den Kamm und spült die Slots mit TBE-Laufpuffer. Nach Anlegen der Spannung dauert es etwa 10 Minuten, bis die Elektrophoresekammer eine Temperatur von ca. 50 °C erreicht hat und beladen werden kann.

Vorbereitung der PCR-Produkte für die Elektrophorese

Jeweils 3 µl PCR-Produkt werden in mit 3 µl Ladepuffer beladene beschriftete Cups pipetiert, im Reaktionsgefäßschüttler gut gemischt und zentrifugiert. Anschließend wird die DNA durch 5-minütiges Erhitzen auf 94 °C in Einzelstränge aufgetrennt. Durch schockartiges Abkühlen der Cups auf Eis wird ein Zusammenlagern komplementärer Bereiche weitgehend verhindert. Nach erneutem Spülen der Slots werden die Proben (6 µl), die Negativkontrolle (6 µl) und der Marker (1,6 µl), der gleichzeitig als Positivkontrolle fungiert, zügig aufgetragen. Bei 50 °C erfolgt die elektrophoretische Auftrennung über einen Zeitraum von etwa 90 Minuten. Die benötigte Spannung ist von der Außentemperatur abhängig und beträgt zwischen 1500 und 2000 Volt. Am Ende der Laufzeit wird der Laufpuffer abgegossen und die Gelkammer vorsichtig von dem auf der Glasplatte liegenden Gel abgelöst.

2.3.3 Silberfärbung

2.3.3.1 Grundlagen

Die auf der Methode von Budowle et al.¹²⁶ basierende Silberfärbung beruht auf der Reduktion von löslichen Silberionen zu metallischem Silber durch das Reduktionsmittel Formaldehyd im Gemisch mit Na_2CO_3 . Voraussetzung für das Sichtbarmachen der DNA-Banden in Form eines schwarz-braunen Silber-Niederschlags ist, dass das Redoxpotential der Reaktion so gewählt wird, dass die Silberionen nur in Gegenwart von DNA reduziert werden können.

2.3.3.2 Durchführung

Für die Färbung wird ein Plastikrahmen auf das Gel gelegt, mit Klammern festgespannt und dann das Gel mit folgenden Lösungen behandelt:¹²⁷

Schritt	Lösung	Zeit	Effekt
1	10 % Ethanol	5 min	Fixierung
2	1 % Salpetersäure	3 min	Oxidation
3	Aqua dest.	1 min	Waschen
4	0,012 M Silbernitrat	20 min	Färben
5	0,28 M Na_2CO_3 / 0,019 % Formalin	mehrmals, bis zum Erscheinen von Banden	Entwickeln
6	10 % Essigsäure	2 min	Abstoppen
7	Aqua dest.	2 min	Waschen

Tabelle 7: Durchführung der Silberfärbung

Um das Gel von der Glasplatte zu entfernen, wird Whatman-Chromatographiepapier zugeschnitten, auf das Gel gelegt und nach leichtem Andrücken mitsamt des Gels von der Glasplatte abgezogen. Die Trocknung des mit Frischhaltefolie abgedeckten Gels erfolgt über 60 bis 120 min bei 80 °C im Vakuum-Geltrockner.

Das fertige Gel wird nach Abziehen der Frischhaltefolie mit Folienstift beschriftet.

2.3.4 Auswertung

2.3.4.1 Grundlagen

Die in der PCR-Reaktion vervielfältigte DNA erscheint im Silbergel in Form von schwarz-braunen Banden. Wegen des ausgeprägten interindividuellen Polymorphismus innerhalb der Mikrosatelliten-DNA liegen das väterliche und mütterliche Allel meist in unterschiedlicher Länge an Basenpaaren vor. Diese Heterozygotie wird durch das Erscheinen zweier distinkter Allel-Banden-Muster im Gel sichtbar. Rückschlüsse auf die Basensequenz können daraus allerdings nicht geschlossen werden. Im selteneren Falle einer gleichen Länge an Basenpaaren im mütterlichen und väterlichen Allel entstehen identische Banden (nicht informativ für die LOH-Analyse). Durch Vergleich von Tumor und zugehörigem Normalgewebe können mittels der LOH-Analyse Deletionen, der Verlust von ganzen Chromosomen und mitotische Rekombinationen erfasst werden.

Zusätzlich werden auch **Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI)** erfasst. Diese entstehen durch Funktionsausfall sog. **Mismatch-Repair-Proteine** und stellen Replikationsfehler in hochrepetitiven DNA-Abschnitten dar. Folge ist eine Längenveränderung (meist eine Verkürzung) der Mikrosatelliten-DNA in den betroffenen Zellen. Im Tumor treten gegenüber dem Normalgewebe eine oder mehrere neue Bande auf. Dieses Phänomen wird als **Allel-Shift** bezeichnet.^{128, 129}

2.3.4.2 Interpretation

Bei einem Patienten mit einem heterozygotem Status, d.h. zwei unterschiedlichen Allel-Banden-Mustern im Normalgewebe wird ein LOH diagnostiziert, wenn im Tumorgewebe nur eine Bande vorhanden ist. In der Praxis sieht man anstatt des kompletten Verlustes eines Allels meist jedoch nur eine schwächere Bandenintensität. Ursache hierfür sind Kontaminationen der Tumoreale durch Lymphozyten, Makrophagen und Stromazellen, die im Gegensatz zu den Tumorzellen das zweite Allel nach wie vor enthalten. Auch beim Normalgewebe werden nicht immer beide Allele gleich stark amplifiziert. Dies kann an einer unterschiedlichen Schädigung durch Fixierung, Polymorphismus im Bereich der zum Primer komplementären Sequenz, spezifischen Inhibitoren oder bevorzugter Amplifikation des kürzeren Allels liegen. Entsprechend nimmt man das Verhältnis der beiden Banden im Normalgewebe als Referenz. Ein LOH liegt vor, wenn sich das Verhältnis der Tumor-Banden deutlich, d.h. über 50 % vom Verhältnis der Normal-Banden unterscheidet. Um

sicher zu gehen werden alle fraglichen LOH-Fälle und solche mit sicherem LOH in einer zweiten MSI-Analyse verifiziert.

Patienten mit homozygotem Allelstatus im Normalgewebe sind für die LOH-Analyse nicht geeignet und werden als NI („nicht-informativ“) bezeichnet. Finden sich beim Tumorgewebe zusätzliche, im Normalgewebe nicht vorhandene Banden, so wird eine MSI diagnostiziert.

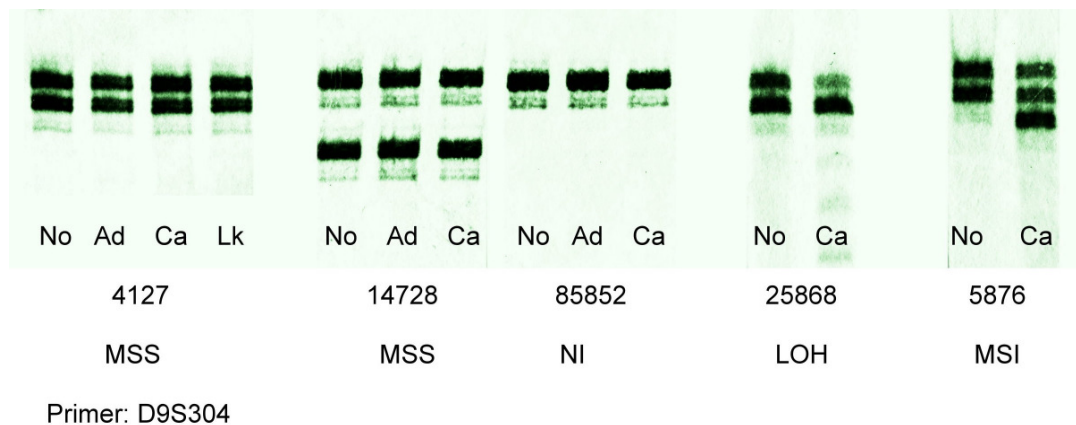


Abbildung 4: Typische Befunde in der Silberfärbung (MSS: Mikrosatelliten-stabil, NI: nicht informativ, LOH: Loss of Heterozygosity, MSI: Mikrosatelliten-instabil. NI: nicht informativ; No: Normalgewebe; Ad: Adenomgewebe; Ca: Karzinomgewebe. NI: Normal-, Adenom- und Karzinomgewebe sind für den Mikrosatelliten-Marker D9S304 homozygot; die schwache obere Bande bei dem Fall mit LOH entsteht durch Kontamination der Tumorzell-DNA mit DNA aus normalen Zellen, z.B. Lymphozyten; der Fall mit MSI besitzt im Vergleich zum Normalgewebe eine zusätzliche Bande.)

2.3.4.3 Umgang mit Fehlerquellen

Die unvermeidliche Kontamination der Tumor-DNA mit Normalgewebe-DNA führt dazu, dass wie beschrieben bei LOH meist eine schwächere zweite Bande vorhanden ist. Mit Abnahme des Verhältnisses von Tumor-DNA zu Normalgewebe-DNA steigt daher die Häufigkeit von falsch-negativen Ergebnissen. Durch manuelle Mikrodisektion können die von Boehm et al. ¹³⁰ geforderten mindestens 70 – 80 % Tumorzellgehalt jedoch gut erreicht werden. Auch die absolute Anzahl der dissezierten Zellen spielt eine wichtige Rolle, da eine zu geringe Menge an Tumorzellen durch inhomogene Amplifikation der Allele zu falsch positiven (nur ein Allel vervielfältigt) oder falsch negativen (das nicht-deletierte Allel wird ebenfalls nicht amplifiziert) Resultaten führen kann. Es sollten daher mindestens 30-50, besser 100 Zellen aus Paraffinmaterial gewonnen werden. ¹²⁸ LOH können weiterhin

auch durch eine zu hohe Anzahl an Zyklen bei der PCR verdeckt werden, da dann DNA aus kontaminierenden Normalzellen die sogenannte Plateauphase erreicht. Der Tumor wird folglich im Silbergel heterozygot. Gut geeignet ist eine Zyklenzahl von 35, bei geringeren Zahlen erhält man keine befriedigenden Ergebnisse mehr. Bei der Silberfärbung können durch zu lange Färbedauer oder unzureichendes Abstoppen der Reaktion Banden sehr dick und dunkel werden und dadurch LOH-relevante Intensitätsunterschiede verloren gehen.

2.4 METHYLIERUNGSANALYSEN

2.4.1 Grundlagen

Tumorsuppressorgene können durch Methylierungen in CpG-Inselregionen der Promotorregionen inaktiviert werden. Wie bereits beschrieben beruht dieser Mechanismus auf der Übertragung eines Methylrestes von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf Cytosin durch DNA-Methyltransferasen.²⁵ Das nach dieser Reaktion vorliegende 5-Methyl-Cytosin besitzt eine gewisse Tendenz zur Desaminierung zu Thymin, wodurch eine Punktmutation entsteht. Wenn sie nicht repariert wird, kommt es zum Verlust des CpG-Dinukleotid. Diese Transition spielt bei der Entstehung des genetischen Polymorphismus in der menschlichen Population eine herausragende Rolle und hat im Laufe der Evolution zu einer Depletion an CpG-Dinukleotiden innerhalb des menschlichen Genoms geführt.²⁵

Einen ähnlichen Mechanismus macht man sich im 1. Schritt der Methylierungsanalyse zu Nutze: anstelle einer Desaminierung des methylierten Cytosin zu Thymin beruht diese Reaktion allerdings auf der Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil.

Der Nachweis von Promotormethylierungen besteht im Wesentlichen aus 4 Schritten:

Das Grundprinzip der **Bisulfidbehandlung** ist die Desaminierung und Sulfonamierung von freiem Cytosin zu Uracil. Dieser Vorgang kann allerdings nur erfolgen, wenn eine DNA-Sequenz in nicht-methylierter Form vorliegt, im Falle einer 5-Methylierung wird die Reaktion blockiert. Es entstehen in der Folge zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen, die **in der Methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR)** durch **DNA-Amplifikation** mit zwei verschiedenen Primerpaaren vervielfältigt werden. Die Primer werden als M-Primer (für die methylierte Sequenz) und U-Primer (für die unmethylierte Sequenz) bezeichnet. Eine Bindung der M-Primer an die U-Sequenz und umgekehrt darf nicht möglich sein.

Die beiden Amplifikate zeigen dann in der **Polyacrylamid-Gelelektrophorese** unterschiedliche Wanderungseigenschaften, die z.B. auf Ladungs- oder Längenunterschieden beruhen kann (siehe 2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese).

In der **Silberfärbung** wird wie bei der MSI-Analyse die DNA durch Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber sichtbar gemacht.

2.4.2 Durchführung

2.4.2.1 Bisulfidbehandlung

Die Bisulfidbehandlung wird mittels des CpGenome DNA Modification Kit (Qbiogene, Irvine, USA) durchgeführt.

Zur **DNA-Denaturierung** werden 10 µl der DNA (100 ng/µl), 2 µl von Reagenz IV des Kit, 88 µl Aqua dest. und 7 µl NaOH in ein 2-ml-Gefäß gegeben, gut gevortext und dann über 10 Minuten in den Heizblock bei 37 °C gestellt. Zusätzlich zur Proben-DNA verwendet man methylierte Standard-DNA als Positivkontrolle und präparierte Blut-DNA als Negativkontrolle.

Sulfonamierung und Desaminierung geschehen nach Zugabe von 550 µl Modifikationslösung I während einer 16-stündigen Inkubation. Im nächsten Schritt gibt man 5 µl Reagenz III (vorher resuspendiert) und 750 µl Modifikationslösung II zur DNA und mischt durch Vortexen. Die sich in Reagenz III befindlichen Carrierpartikel binden dann während einer 10-minütigen Inkubationszeit an die DNA. Nach 1 Minute Zentrifugation bei 7.500 rpm kann der Überstand verworfen und 1 ml Ethanol 70 % hinzugegeben werden. Nach Vortexen erfolgt eine erneute Zentrifugation. Insgesamt muss dieser Schritt drei Mal wiederholt werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 15.000 rpm über 3 Minuten kann der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen werden.

Die Umwandlung von Cytosin in Uracil wird durch **Desulfonamierung** abgeschlossen. Dies geschieht durch Zugabe von 50 µl der 20 mM NaOH/Ethanol 90 %-Lösung, Vortexen und Inkubieren bei Raumtemperatur über 5 Minuten.

Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 7.500 rpm wird der Überstand abgenommen, 1ml Ethanol 90 % hinzugegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Dieser Schritt wird ein zweites Mal wiederholt, anschließend wird für 5 Minuten mit 15.000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur über 20 Minuten getrocknet.

Nach Resuspension in 50 µl TBE-Pufferlösung und Inkubation über 15 Minuten bei 55 °C (Ablösen der DNA vom Carrier-Partikel) im Heizblock erfolgt der letzte Zentrifugationsschritt bei 15.000 rpm für 3 Minuten und das Überführen des Überstandes in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß.

2.4.2.2 Methylierungsspezifische PCR

Für den PCR-Ansatz werden 3,5 µl der bisulfidbehandelten DNA, 1,5 µl MgCL₂-Lösung, 2,5 µl Pufferlösung, 1,25 µl Primer V und 1,25 µl Primer R, 2,0 µl Nukleotide, 0,1 µl DNA Polymerase und 12,9 µl Aqua dest. in ein Cup pipettiert, gut gevortext und dann die DNA im PTC-200 vervielfältigt. Dabei sind die einzelnen Arbeitsschritte wie folgt programmiert:

Schritt	
1	95 °C für 10 Minuten
2	95 °C für 1 Minute
3	60 °C für 1 Minute
4	72 °C für 2 Minuten
5	72 °C für 10 Minuten
6	35 x Schritt 2-5
7	10 °C bis zur Entnahme aus dem Gerät

Tabelle 8: Programmierung des PCR-Geräts für die methylierungsspezifische PCR:

Von jeder der bisulfidbehandelten DNA-Proben wird je ein PCR-Ansatz mit dem Primer-paar M und U pipettiert.

Name	Art	Richtung	Sequenz 5'
MLH1 F	unmethyliert	vorwärts	-gAAgAgTggATAgTgATTTTAAATgT-
MLH1 R	unmethyliert	rückwärts	- ATCTCTTCATCCCTCCCTAAAACA-
MLH1mF	Methyliert	Vorwärts	- gAAgAgTggATAgTgATTTTAAATgT-
MLH1mR	Methyliert	Rückwärts	- TCTTCgTCCCTCCCTAAAACg-

Tabelle 9: Primer für die methylierungsspezifische PCR

2.4.2.3 PAA-Gelelektrophorese

Nach Reinigung mit Isopropanol und Abtrocknen befeuchtet man eine der beiden ca. 2 mm dicken Glasplatten mit Aqua dest., legt unter Vermeidung von Blasenbildung ein Stück einer GEL-FIX PAG-Folie auf und trägt das fertiggerührte Elektrophoresegel auf die obere Hälfte der Glasplatte auf. Durch vorsichtiges Aufsetzen und langsames Herunterlassen der zweiten Glasplatte verteilt sich das Gel blasenfrei zwischen diesen. Durch ca. 2 mm dicke Abstandshalter im Randbereich einer der verwendeten Glasplatten entsteht eine konstante Geldicke. Das Aushärten des Gels geschieht zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Kühlschrank.

Am nächsten Tag gibt man das Elektrophoresegel in das Elektrophoresegerät (MultiphorII, Pharmacia Biotech, Cambridge, England), legt die Applikationsplättchen auf und trägt jeweils ein Volumen von 7 µl in der Reihenfolge Längenstandard VIII – Leerprobe – Positivkontrolle – Negativkontrolle - PCR-Produkt auf. Bei den PCR-Produkten wird im Wechsel die mit M- und U-Primern amplifizierte Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wird nach Auflegen von TBE-Laufpuffer-getränkten Pufferstreifen auf das Gel gestartet. Die eingesetzte Leistung beträgt zunächst 5 Watt über 20 Minuten und wird dann auf 15 Watt erhöht, wobei eine automatische Regelung von Spannung und Stromstärke erfolgt. Nach einem Zeitraum von 1-2 Stunden hat die Lauffront das Ende des Gels erreicht und die Elektrophorese wird beendet.

2.4.2.4 Silberfärbung

Das aus dem Elektrophoresegerät entnommene Gel wird in Salpetersäure 3 % so lange geschwenkt, bis eine gelbe Lauffront sichtbar wird und dann dreimal mit Aqua dest. gespült. Anschließend gibt man das Gel in den Schwenker und lässt über einen Zeitraum von 20 Minuten die zuvor frisch hergestellte Silbernitratlösung 0,2 % einwirken. Nach drei weiteren Waschschritten mit Aqua dest. wird das Gel mit der Natriumcarbonat-Formalin-Lösung bis zum Erscheinen der Banden gefärbt. Die Färbelösung muss dabei regelmäßig ausgetauscht werden. Das Abstoppen der Färbereaktion geschieht durch Schwenken in Essigsäure 10 % über 2 Minuten. Nach erneutem dreimaligen Spülen mit Aqua dest. und Fixierung in der 5%igen Glycerollösung kann das Gel an der Luft getrocknet und ausgewertet werden. Dazu werden die beiden zusammengehörenden Banden anhand des Längenstandards miteinander verglichen. Methylierte Tumoren wurden mit „1“ bezeichnet, unmethylierte mit „0“.

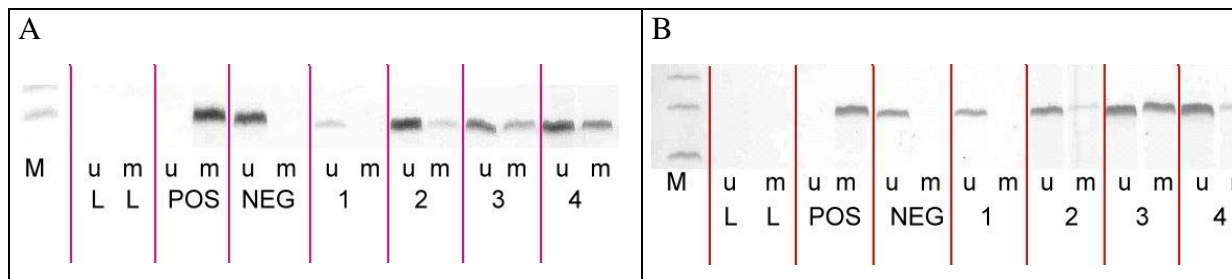


Abbildung 5: Ergebnis einer Silberfärbung nach methylierungsspezifischer PCR.

(Gel A: Ex-Adenom-Karzinome; Gel B: De-novo-Karzinome M: Marker; L: Leerproben X: PCR ohne DNA, POS: Positivkontrolle, NEG: Negativkontrolle, u: unmethyliert, m: methyliert, 1-4: Tumorproben)

2.5 HERSTELLUNG VON TISSUE-MIKRO-ARRAYS

2.5.1 Grundlagen

Die Herstellung von immunhistochemischen und insbesondere von FISH-Präparaten ist ein sowohl zeitlich als auch finanziell sehr aufwendiges Unterfangen. Eine elegante Lösung bei einer großen Anzahl an zu untersuchenden Gewebeproben ist die Herstellung von Tissue-Mikro-Arrays (TMA). Hierfür werden Schnitte von zuvor in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebestanden hergestellt. Bei entsprechend geringem Durchmesser von 0,6 mm können bis zu tausend Gewebezylinder in einen einzigen Mikroarray gepackt werden.

Die für unsere Arbeiten hergestellten, auf einen normalen Standardobjektträger passenden TMAs bestehen aus vier Unterblöcken, zwei größeren mit 17x9 möglichen Stanzen (A+B) und zwei kleineren mit 13x9 möglichen Stanzen (C+D). Die Aufteilung der Gewebestanden in 4 Untereinheiten ermöglicht eine bessere Übersichtlichkeit. In unserem Fall befanden sich auf dem Array 1 529 Gewebestanden und 23 weitere auf dem Array 2. Diese Anzahl kommt dadurch zustande, dass nach Möglichkeit mehrere Gewebestanden aus einer Gewebeprobe entnommen wurden, zum einen um die Heterogenität von Tumoren zu berücksichtigen, zum anderen um Ausfall oder Nicht-Repräsentativität einzelner Stanzen kompensieren zu können.

2.5.2 Durchführung

Wie zur Vorbereitung der Mikrodissektion werden zunächst normale HE-Schnitte von in Paraffin eingebettete Gewebeproben angefertigt, relevante Areale markiert und die entsprechenden Gewebebereiche aus den Paraffinblöcken ausgestanzt und in den Mikroarray-Paraffinblock eingebettet. Um insbesondere bei der Herstellung von TMAs mit kleinem Stanzendurchmesser ein problemloses Ausstanzen und exaktes Platzieren zu ermöglichen, verwendet man anstatt von Handstanzen ein Gewebe-Array-Stanzgerät (MTA-1 Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Sun Prairie, USA). Hauptkomponenten sind zwei dünne Hohlzylinder mit geschärfter Spitze. Die kleinere Nadel mit einem Außendurchmesser von 600 µm wird zum Ausstanzen von Paraffinzylinder aus dem 20 x 40mm messenden Empfängerblock verwendet, die größere Nadel, mit der man die Stanzen aus den Gewebeblocken entnimmt, hat entsprechend einen Innendurchmesser von 600 µm. Durch bewegliche Stahlzylinder im Inneren der Nadel wird das ausgestanzte Material aus der Nadel ausgestoßen. Zusätzlich kann die jeweilig gewünschte Eindringtiefe beim Stanzen eingestellt werden. Um eine gute Einbindung der Stanzzylinder in den Empfängerblock zu gewährleisten, wird dieser am Ende der Stanzprozedur vorsichtig auf 64 °C erwärmt und abschließend mit flüssigem Paraffin übergossen. Danach können wie bei konventionellen paraffineingebetteten Gewebeproben Schnitte zur weiteren Verwendung angefertigt werden, in unserem Falle Standard-HE-Schnitte, immunhistochemisch gefärbte Schnitte und FISH-Präparate



Abbildung 6: MTA 1 Manual Tissue Arrayer 1^{®131} mit TMA-Schnitt nach HE-Färbung

2.6 FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG

2.6.1 Grundlagen

Grundlegendes Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist die Bindung von mit fluoreszierenden Molekülen versehenen Einzelstrang-DNA-Sonden an chromosomale DNA. Diese Hybridisierung findet direkt in den Zellkernen der auf einem Objekträger fixierten zu untersuchenden Zellen bzw. Gewebe statt.

Natürlicherweise liegt DNA in einem Doppelstrang aus zwei komplementären Einzelsträngen vor, die durch Erhitzen voneinander getrennt werden und sich beim Abkühlen wieder aneinander lagern. Durch Zugabe von Sonden-DNA bindet diese mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit an die Zielsequenz und markiert sie. Unter dem Mikroskop können sowohl die genaue Position als auch Anzahl der untersuchten DNA-Sequenzen festgestellt werden. Durch die Verwendung fluoreszierender Marker unterschiedlicher Wellenlänge bei der Herstellung der Gensonden ist eine gleichzeitige Untersuchung mehrerer Genabschnitte möglich.¹³²

Die Auswertung erfolgt mit speziellen Fluoreszenz-Mikroskopen nach folgendem Prinzip: Die mit sichtbarem Licht angeregten Marker-Moleküle emittieren spezifisch Licht einer bestimmten Wellenlänge. Da die Intensität der Fluoreszenzsignale im Verhältnis zur Intensität des anregenden Lichts sehr viel geringer ist und somit durch das menschliche Auge nicht erfasst werden kann, ist es zusätzlich notwendig, spezielle nur für die verwendeten Wellenlängen durchlässige Filter zwischen Mikroskop-Linse und Auge vorzuschalten. Zusätzlich muss die Auswertung in einer Dunkelkammer erfolgen, um dem Auge eine bestmögliche Dunkeladaptation zu ermöglichen.

2.6.2 Durchführung

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir den UroVysion[®] Bladder Cancer Kit (UroVysion[®] Kit) der Firma Vysis, der konzipiert wurde, Aneuploidie der Chromosomen 3, 7, 17 und den Verlust des 9p21 Genorts von urothelialen Zellen aus Harnblasenspülzytologien nachzuweisen. Er enthält 4 unterschiedlich farbigen Sonden für die spezifische Regionen der Chromosome 3, 7, 9 und 17. Im Einzelnen sind dies die Chromosome Enumeration Probe (CEP) CEP 3 SpectrumRed , CEP 7 SpectrumGreen, CEP 17 SpectrumAqua und der Locus Specific Identifier (LSI) 9p21 SpectrumGold. Durch die Synthese der Sonden aus mit fluoreszierenden Seitengruppen modifizierten dNTPs wird bereits bei einem einzigen Hybridisierungsschritt eine ausreichende Signalstärke erreicht.¹³² Zusätzlich werden die Präparate mit Diamino-Phenyl-Indol (DAPI) gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen.

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung werden die Zellen zur Vorbehandlung u.a. erhitzt, um ihre chromosomale DNA zu denaturieren und somit den DNA-Sonden Zugang zu ihrer komplementären Sequenz zu ermöglichen. Die eigentliche Hybridisierung geschieht durch Abkühlen auf eine für den Vorgang optimale Temperatur.

Protokoll der UroVysion[®]-Färbung dargestellt in Tabellenform (Tabelle 10).

Durchführung der UroVysion®-Färbung					
	Schritt	Durchführungs-Ort, Gerät	Behandlung des Objektträger mit TMA	Dauer	Temp.
1.	Entparaffinierung	Brutschrank	Inkubation im Brutschrank	25 min	72 °C
		Färberaum	Xylolbad	2x 10 min	RT
2.	Nachfixierung	Färberaum	Carnoybad	20 min	RT
		Färberaum	Acetonbad	20 min	RT
		Färberaum	Methanolbad	20 min	RT
3.	Wasserentzug + Xylol-Entfernung	Färberaum	absteigende Ethanolreihe (100 %, 85 %, 70 %)	je 1 min	RT
		Färberaum	Waschen in Aqua dest.	kurz	RT
4.	Vorbehandlungen	Wasserbad	Tauchbad in 0,01 M NaCitrat	40 min	95 °C
		Wasserbad	Tauchbad in 0,1 % Pepsin (mit 0,01M HCl)	10 min	37 °C
5.	Waschvorgang	Färberaum	aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 85 %, 100 %)	je 1 min	RT
		Färberaum	2x Waschen in SSC	kurz	RT
X.	Sonden-Denaturierung	Wasserbad	Sonde rechtzeitig ins Wasserbad legen	5-15 min	73 °C
6.	Gewebe-Denaturierung	Färberaum	Sonde auf OT geben (Menge je nach Schnittgröße)		RT
		Färberaum	Deckglas aufbringen		RT
		Färberaum	Deckgläser luftdicht mit Marabu-Fixogumm abschließen		RT
		Heizplatte	Denaturierung auf Heizplatte	5 min	73 °C
7.	Hybridisierung + Sonden-Inkubation	Brutschrank	Inkubation in feuchter Kammer	über Nacht	37 °C
8.	Waschvorgang	Färberaum	Deckglas vorsichtig entfernen		RT
		Wasserbad	4x mit SSC waschen	10 min	50 °C
		Wasserbad	2x mit SSC waschen	10 min	50 °C
		Wasserbad	1x SSC mit waschen	10 min	50 °C
9.	DAPI-Färbung + Nachbehandlung	Färberaum	Bad in Millipore-Wasser	1 min	RT
		Färberaum	DAPI auf OT geben (Menge je nach Schnittgröße)		RT
		Färberaum	Deckgläser fest auf OT drücken (luftdicht abschließen)		RT
		Abzug	Deckgläser mit Entellan umranden		RT
	Lagerung	Kühlschrank	Kühlung und Vermeidung von Lichtexposition		2-8 °C

Tabelle 10: Durchführung der UroVysion®-Färbung (RT = Raumtemperatur, OT: Objektträger, X: Arbeitsschritt erfolgt parallel zu anderen Vorgängen, SSC: Saline-sodium citrate buffer, DAPI: Diamino-Phenyl-Indol)

2.6.3 Auswertung

Die Auswertung der Mikroarrays erfolgte in der Dunkelkammer mit Hilfe eines Aristoplan Fluoreszenzmikroskops (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar). Die Bewertung orientierte sich dabei an in der Literatur beschriebenen Kriterien,¹³³⁻¹³⁶ die bereits seit längerem auch am Institut für Pathologie der Universität Regensburg für die Auswertung von Urothel-Gewebe angewandt werden.^{137, 138}

Nach Einprägen der wesentlichen histomorphologischen Strukturmerkmale einer Tumorstanze am HE-Schnitt bei 400facher Vergrößerung wurde die entsprechende UroVysion[®]-gefärbte Stanze bei vorgeschaltetem DAPI-Filter unter dem Mikroskop eingestellt, auf übereinstimmende Histomorphologie überprüft und dann bei 1000facher Vergrößerung und Ölimmersion systematisch von rechts oben nach links unten ausgezählt. Hierzu wurden unter Zuhilfenahme der DAPI-Färbung nur nicht-überlappende intakte Epithel-Zellkerne mit der für die jeweilige Gewebeart typischen Morphologie ausgewählt. Kleine lymphozytenähnliche nicht-intakte Zellen blieben unberücksichtigt. Genspezifische Signale mit einem Abstand von weniger als 0,5 µm wurden im Sinne eines einzigen Signals gewertet. Pro Stanze wurden jeweils 50 Zellkerne ausgewählt. Waren weniger geeignete Zellkerne vorhanden, wurden mindestens 25 Zellen ausgewertet oder die Stanze als nicht auswertbar markiert. Für jede Stanze wurde jeweils der Mittelwert an durchschnittlich pro Zelle enthaltenen p16^{INK4a}-Signalen gebildet.

Um bei der Verwendung von histologischen Schnitten entstehende Signalverluste und Artefakte durch Chromosomeninstabilität berücksichtigen zu können, wurde anhand von 20 Normalgewebeproben unter Verwendung einer dreifachen Standardabweichung ein Cut-off von 1,13 Signalen pro Tumorzelle errechnet, unterhalb dessen das Gewebe als „deletiert“ gewertet wurde.

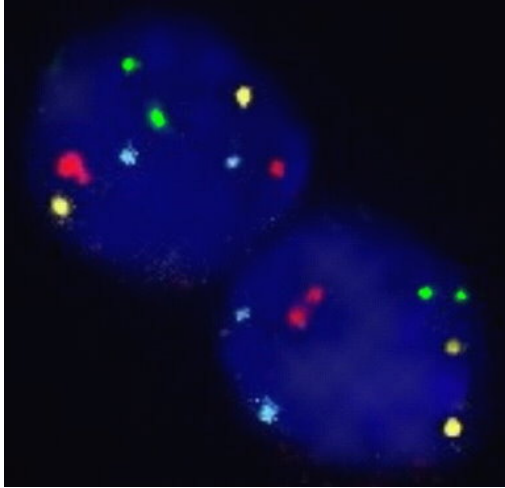


Abbildung 7: UroVysion®-Färbung von Normalgewebe

Es sind jeweils 2 rote (Chromosom 3), grüne (Chromosom 7), blaue (Chromosom 17) und gelbe (p16^{INK4a}) Signale vorhanden. Dieser Befund entspricht dem von Normalgewebe.

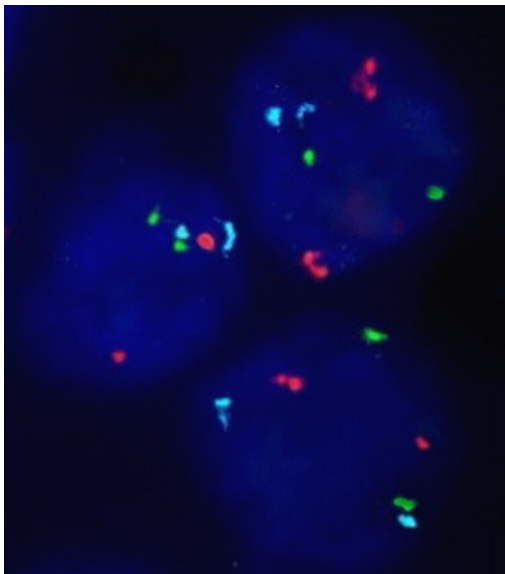


Abbildung 8: UroVysion®-Färbung bei p16^{INK4a}-Signalverlust

Die Zentromersonden rot, grün, blau sind jeweils 2x vorhanden, die gelbe p16^{INK4a}-Sonde fehlt vollständig. Dieser Befund entspricht einem Verlust von p16^{INK4a} auf beiden Chromosomen.

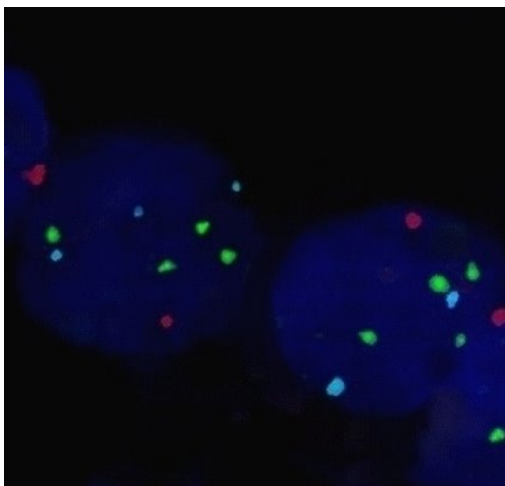


Abbildung 9: UroVysion®-Färbung p16^{INK4a}-Verlust in Kombination mit anderen Alterationen

Verminderte Anzahl der gelben (0x) und roten (1x), Zunahme der grünen (4x) und blauen (3x bzw. 2x) Signale. Dieser Befund entspricht einem kompletten p16^{INK4a}-Verlust, einer Monosomie von Chromosom 3 und Polysomie von Chromosom 7 und 17.

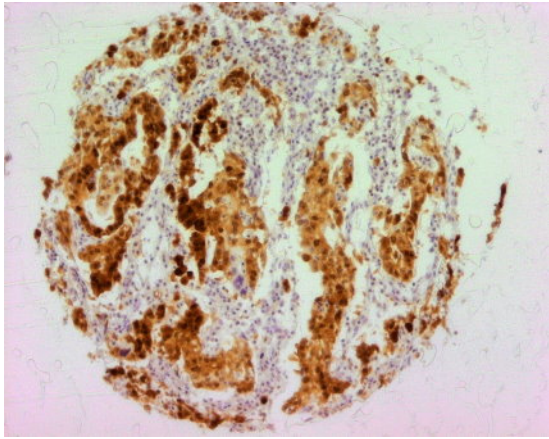
2.7 P16^{INK4A}-IMMUNFÄRBUNG VON TISSUE-MIKRO-ARRAYS

2.7.1 Grundlagen

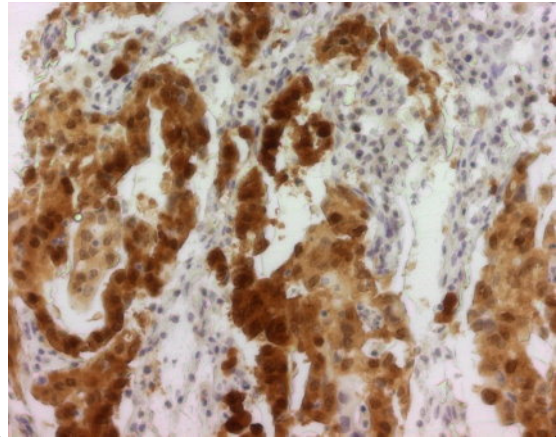
Der Nachweis von p16^{INK4a}-Protein in der Immunhistochemie beruht darauf, dass das p16^{INK4a}-Antigen durch einen spezifischen Antikörper markiert wird, an den wiederum ein zweiter enzymgekoppelter Antikörper bindet. Nach Zugabe eines Chromogens entsteht ein sichtbarer Farbstoff, der lichtmikroskopisch als nukleäre und/oder zytoplasmatische Färbung ausgewertet werden kann.

2.7.2 Durchführung

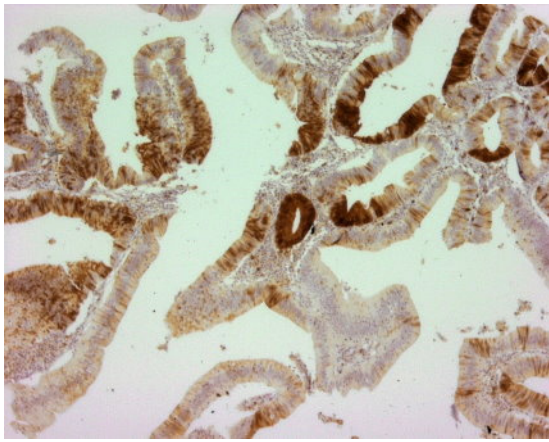
Von den Array-Paraffinblöcken werden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf mit Haftbeschichtung überzogene Objektträger gebracht (Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey), getrocknet und durch Entparaffinierung mit Xylol (3x 5 min) sowie durch Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua dest. für die immunhistochemische Färbung vorbereitet. Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte in der Mikrowelle über 20 min bei 100 °C mit Bond[®]-Puffer (Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) inkubiert. Die eigentliche Immunfärbung wurde in einem automatischen Färbegerät (Bond[®]-System, Menarini Diagnostics, Florenz, Italien) inkubiert. Die p16^{INK4a}-Detektion erfolgte durch einen monoklonalen p16^{INK4a}-Antikörper (Clone E6h4 MTM Laboratories AG, Heidelberg), für die Immunperoxidasereaktion wurde der ABC-Elite-Vectorstain-Kit[®] (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Als Negativkontrolle wurde die Färbung ohne Zusatz des Antikörpers durchgeführt. Nach Abschluss der Immunfärbung wurde eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt, anschließend wurden die Schnitte eingebettet.



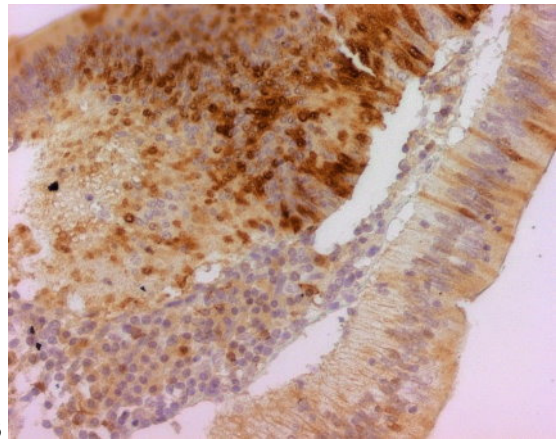
1



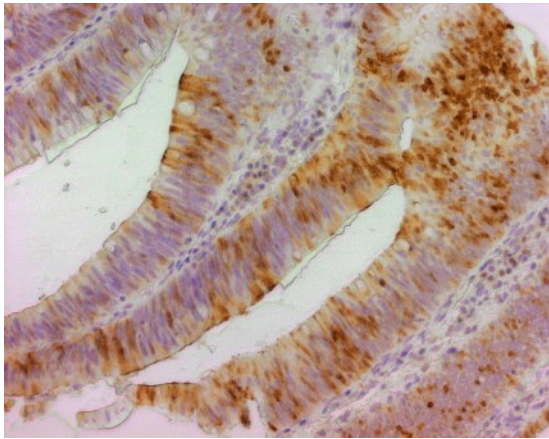
2



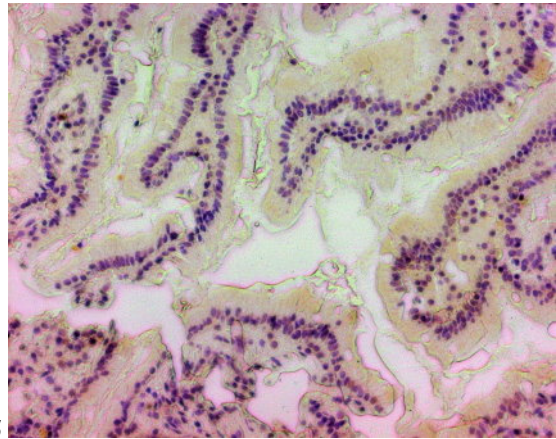
3



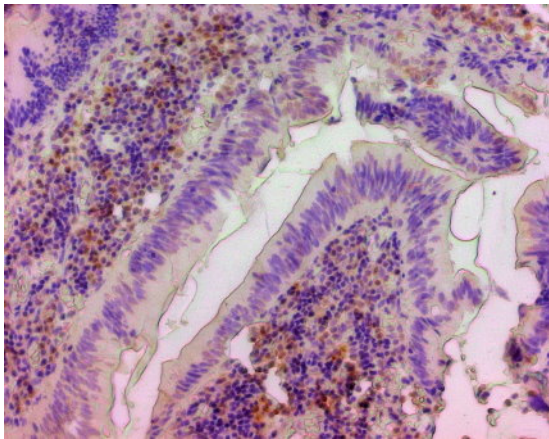
4



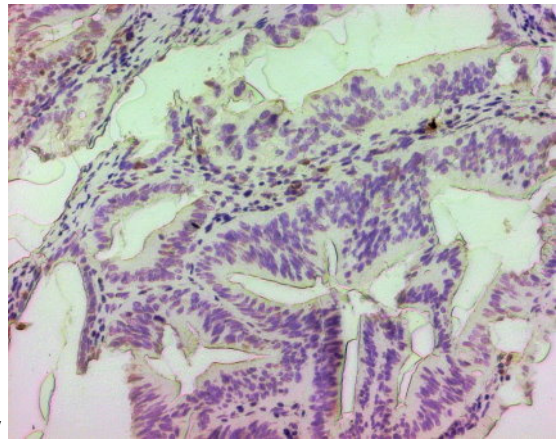
5



6



7



8

Abbildung 10:

- 1+2: Karzinom mit starker p16^{INK4a}-Färbung in 90 % der Zellen
- 3+4: Karzinom mit stark ausgeprägter Intensität nukleärer und zytoplasmatischer p16^{INK4a}-Expression in 30 % der Zellen
- 5: Adenom mit mittlerer nukleärer und zytoplasmatischer p16^{INK4a}-Expression in 30 % der Zellen
- 6: Normalgewebe mit leichter nukleärer und zytoplasmatischer p16^{INK4a}-Expression in 1 % der Zellen
- 7: Adenom mit Verlust der nukleären und zytoplasmatischen p16^{INK4a}-Expression, deutliche p16^{INK4a}-Expression im Stroma
- 8: Karzinom mit Verlust der nukleären und zytoplasmatischen p16^{INK4a}-Expression, p16^{INK4a}-Expression im Stroma

Die lichtmikroskopische Auswertung der immungefärbten Microarrays erfolgte unter Berücksichtigung von Prozentsatz gefärbter Zellen und Färbintensität, unterschieden nach 0 (keine Färbung vorhanden), I (leichte Färbung), II (mittlere Färbung) und III (starke Färbung). Für die Prozentzahlen wurden die Stufen 0 % (keine Färbung), 1 %, 2-10 %, 11-20 %, 21-30 %, u.s.w. berücksichtigt. p16^{INK4a}-Verlust wurde schließlich bei 0 % positiver Färbung, p16^{INK4a}-Überexpression bei >70% positiver Färbung definiert.

2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle statistischen Analysen wurden unter Benutzung des Statistikprogramms SPSS Version 13.0 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Die Überprüfung der statistischen Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen, morphologischen, immunhistochemischen und molekularen Parametern wurde anhand des zweiseitigen Fischer-Exakt-Tests überprüft. Mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurde die Gesamt-Überlebenszeit, gemessen ab dem Zeitpunkt der Operation, bestimmt. Für die Berechnung der Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne die jeweiligen klinischen, pathologischen, morphologischen oder molekularen Faktoren wurden zweiseitige Log-Rank-Statistiken ermittelt. Unterhalb eines p-Werts von 0,05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant gewertet. Die Proportionalitätshypothesen für alle Variablen wurden mit log-negativen Log-Überlebensverteilungsfunktionen bewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINISCH-PATHOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Die epidemiologischen und klinisch-pathologischen Eigenschaften der untersuchten Papillentumore werden ausführlich in einer parallel angefertigten Dissertation vorgestellt.¹³⁹ Im Folgenden sind kurz einige wesentliche Aspekte aufgeführt.

3.1.1 Papillenkarzinome

Es wurden Karzinome (Ca) von 170 Patienten untersucht. Die Unterscheidung in histologische Subtypen zeigte am häufigsten intestinale (n=79; 46,5 %), gefolgt von pankreatobiliären (n=40; 23,5 %), G3-Adenokarzinomen (n=22, 12,9 %), intestinal-muzinösen (n=14; 8,2 %) und invasiv-papillären Karzinomen (n=9, 5,3 %). Je nach Vorhandensein eines Adenomanteils wurden Ex-Adenom- (Ca-ex-Ad) und De-novo-Karzinome (De-novo-Ca) unterschieden (Tabelle 11). Die mittlere Überlebenszeit betrug 38 Monate (n=118). Das kumulative Überleben von De-novo- und Ex-Adenom-Karzinomen (Abbildung 11) unterschied sich statistisch signifikant (p=0,002, De-novo-Ca: mittlere Überlebenszeit 47 Monate, CI 95: 36-40; Ca-ex-Ad: mittlere Überlebenszeit 99 Monate, CI 95: 79-118). Auch zwischen den histologischen Subtypen bestanden hoch signifikante (p<0,001) Unterschiede (Abbildung 12, Tabelle 11).

Histologischer Subtyp	Papillenkarzinome		
	De-novo-Ca	Ca-ex-Ad	Gesamt
Intestinaler Typ	27 (34,2 %)	52 (65, %)	79 (48,2 %)
Pankreatobiliärer Typ	29 (72,5 %)	11 (27,5 %)	40 (24,4 %)
Intestinal-muzinöser Typ	3 (21,4 %)	11 (78,6 %)	14 (8,5 %)
G3-Adenokarzinom	12 (54,5 %)	10 (45,5 %)	22 (13,4 %)
Invasiv-papillärer Typ	4 (44,4 %)	5 (55,6 %)	9 (5,5 %)
Gesamt	75 (45,7 %)	89 (54,3 %)	164 (100 %)

Tabelle 11: Anzahl und Häufigkeit der histologischen Subtypen von De-novo- und Ex-Adenom-Papillenkarzinomen

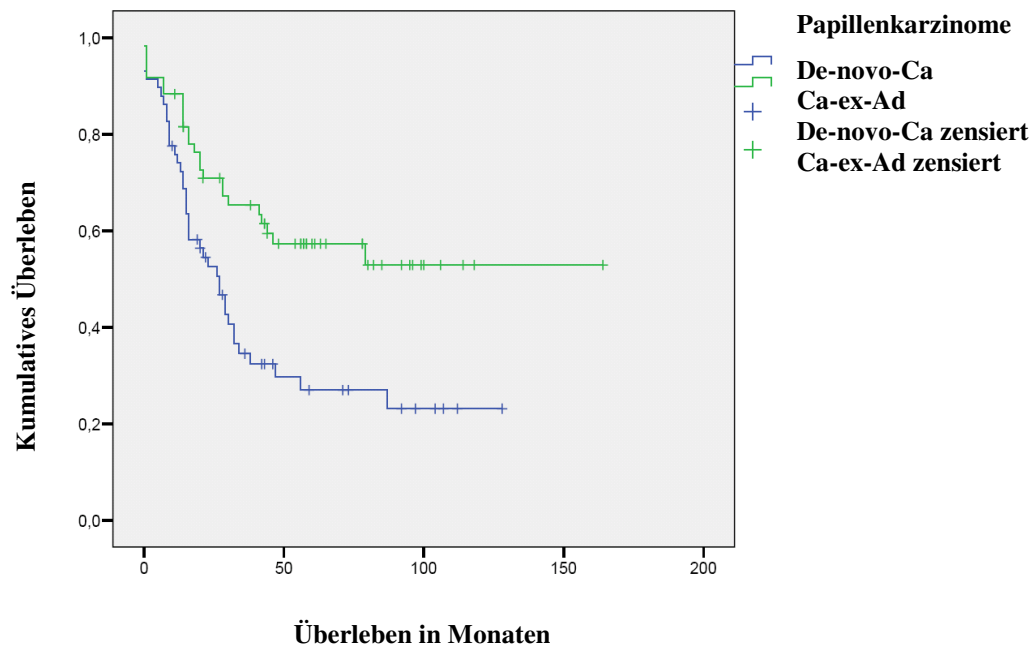


Abbildung 11: Gesamtüberleben bei Patienten mit De-novo- und Ex-Adenom-Papillenkarcinomen; $p=0,002$

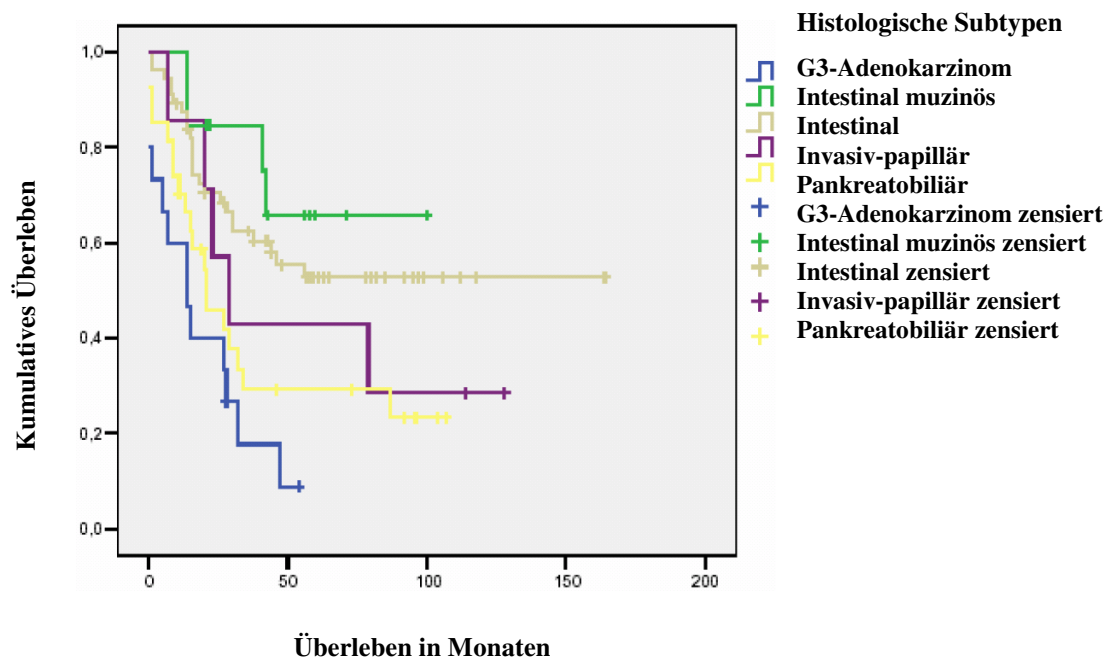


Abbildung 12: Gesamtüberleben bei Patienten mit Papillenkarcinomen in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; $p<0,001$

3.1.2 Dünndarmkarzinome

Es wurden Tumoren von 32 Patienten untersucht. Der häufigste histologische Subtyp war der intestinale (n=23; 71,9 %), gefolgt vom intestinal muzinösen (n=5; 15,6 %) und G3-Adenokarzinomen (n=3, 9,4 %). Ein Tumor war nicht klassifizierbar. Je nach Vorhandensein eines Adenomanteils wurden Ex-Adenom- und De-novo-Karzinome unterschieden (Tabelle 12).

Histologischer Subtyp	Dünndarmkarzinome		
	De-novo-Ca	Ex-Adenom-Ca	Alle Ca
Intestinaler Typ	13 (56,5 %)	10 (43,5 %)	23 (71,9 %)
Intestinal-muzinöser Typ	2 (40,0 %)	3 (60 %)	5 (15,6 %)
G3-Adenokarzinom	3 (100,0 %)	0 (0,0 %)	3 (9,4 %)
Nicht klassifiziert	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)	1 (3,1 %)
Gesamt	18 (56,2 %)	14 (43,6 %)	32 (100 %)

Tabelle 12: Anzahl und Häufigkeit der histologischen Subtypen von De-novo- und Ex-Adenom-Dünndarmkarzinomen

Das mittlere Überleben von Patienten mit Dünndarmkarzinomen betrug 88,6 Monate (CI 95: 61,4-115,8) im Vergleich zu 77,3 Monaten bei Patienten mit Papillenkarzinomen (CI 95: 63,5-91,1) und 20,4 Monaten (CI 95: 8,51-32,3) bei einer Vergleichspopulation von Pankreaskarzinompatienten (Abbildung 13). Der Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,001$). Auch hier war das kumulative Überleben schlechter bei Patienten mit De-novo-Karzinomen (52,1 Monate; CI 95: 30,2-73,9) im Vergleich zu Patienten mit Ex-Adenom-Karzinomen (116,1 Monate; CI 95: 85,6-146; $p = 0,055$; Abbildung 14)

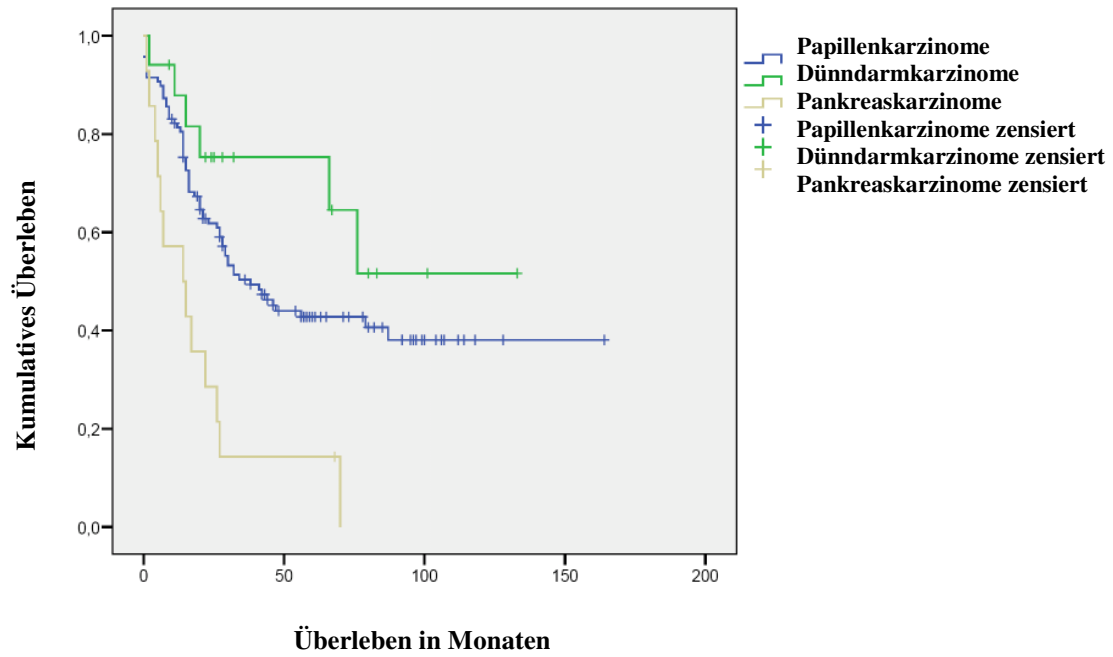


Abbildung 13: Gesamtüberleben bei Patienten mit Papillen-, Dünndarm und Pankreaskarzinomen;
 $p < 0,01$

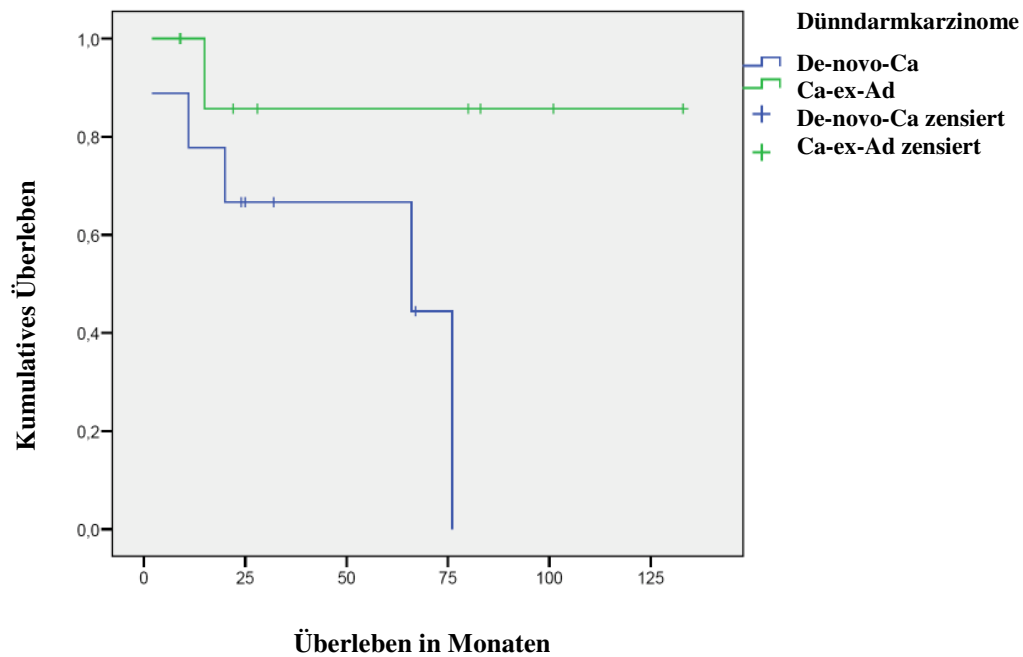


Abbildung 14: Gesamtüberleben bei Patienten mit De-novo- und Ex-Adenom-Dünndarmkarzinomen;
 $p = 0,055$

3.2 FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG

3.2.1 UroVysion[®]-Färbung am TMA

Für diese Arbeit wurden erstmals Tissue-Mikro-Arrays von Papillen- und Dünndarmadenomen und -karzinomen mit dem UroVysion[®]-Kit auf Verlust von p16^{INK4a} untersucht. Da der Kit ursprünglich zur Untersuchung von zytologischen Präparaten konzipiert worden war, musste er für die Verwendung an TMAs von Papillen- und Dünndarmgewebe abgewandelt werden.^{137, 140} Wesentliche Unterschiede im Vergleich zur Auswertung von zytologischen Präparaten waren Zell- und Zellkern-Überlagerungen und in Abhängigkeit von ihrer Größe und Lage „angeschnittene“ Zellkerne. Insgesamt konnten 59 % der Papillenkarcinome und 67 % der Dünndarmkarcinome untersucht werden. Zusätzlich wurden 20 Normalgewebeprobe(n) (No) sowie 45 reine (r-Ad) und 87 karziomassoziierte Adenome (ca-ass-Ad) ausgewertet. Von den reinen Adenomen konnten wegen ausgeprägter Zellüberlagerung nur 16 % ausgewertet werden.

3.2.2 Gewebsspezifische Durchschnittswerte der p16^{INK4a}-Signale

Zunächst wurden gewebespezifische p16^{INK4a}-Mittelwerte für die einzelnen Entitäten errechnet (Tabelle 13). Die Unterschiede waren hochsignifikant ($p < 0,001$; Tabelle 14). Auch Normalgewebe und Karzinome ($p < 0,001$) sowie die beiden Adenom- ($p < 0,001$) und Karzinom-Entitäten ($p < 0,042$) unterschieden sich hochsignifikant. Keine Unterschiede bestanden hingegen zwischen den Mittelwerten von reinen Adenomen und Normalgewebe ($p = 0,52$) sowie von karziomassoziierten Adenomen und Ex-Adenom-Karzinomen ($p = 0,72$).

Gewebe	untersuchte Zellen (n)	p16 ^{INK4a} -Signale (n)	Mittelwert
No	1050	1592	1,52
r-Ad	450	693	1,54
ca-ass-Ad	1625	2072	1,28
Ca-ex-Ad	4191	4191	1,27
De-novo-Ca	3349	4095	1,22

Tabelle 13: Mittelwerte der p16^{INK4a}-Signale in Abhängigkeit von der untersuchten Tumorentität

Gewebe	Mittelwert	Signifikanz-Niveau	Mittelwert	Gewebe
No	1,52	p<0,001	1,24	Ca
No	1,52	p<0,001	1,33	Ad
No	1,52	p=0,52	1,54	r-Ad
No	1,52	p<0,001	1,28	ca-ass-Ad
No	1,52	p<0,001	1,27	Ca-ex-Ad
No	1,52	p<0,001	1,22	De-novo-Ca
r-Ad	1,54	p<0,001	1,28	ca-ass-Ad
Ca-ex-Ad	1,27	p<0,05	1,22	De-novo-Ca
ca-ass-Ad	1,28	p=0,72	1,27	Ca-ex-Ad

Tabelle 14: Korrelation der p16^{INK4a}-Signalmittelwerte in Abhängigkeit von der untersuchten Tumorentität

3.2.3 Häufigkeit von p16^{INK4a}-Signalverlust

P16^{INK4a}-Verlust wurde bei einem Mittelwert von weniger als 1,13 p16^{INK4a}-Signalen pro Zelle definiert. Bei **Papillenkarzinomen** trat p16^{INK4a}-Verlust in 39 von 96 Fällen (40,6 %) auf, bei **Dünndarmkarzinomen** in 6 von 21 Fällen (28,6 %, Tabelle 15). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,335$, $n=117$). **Ex-Adenom-Papillenkarzinome** zeigten p16^{INK4a}-Signalverlust mit 36,5 %, etwas seltener als **De-novo-Papillenkarzinome** mit 45,5 %. Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,41$, $n=96$; Tabelle 16). Die Hälfte der **Ex-Adenom-Dünndarmkarzinome** und 9,1 % der **De-novo-Dünndarmkarzinome** wiesen p16^{INK4a}-Verlust auf. Der Unterschied war jedoch mit $p=0,063$ nicht signifikant (Tabelle 17).

Bei den De-novo-Papillenkarzinomen war Signalverlust in 45,5 % der Fälle anzutreffen gegenüber nur 9,1 % bei den De-novo-Dünndarmkarzinomen. Dieser Unterschied war mit $p=0,037$ statistisch signifikant ($n=55$). Die Häufigkeit von p16^{INK4a}-Signalverlust war bei Ex-Adenom-Papillenkarzinomen mit 36,5 % etwas niedriger als mit 50,0 % bei Ex-Adenom-Dünndarmkarzinomen ($p=0,323$; $n=62$;).

	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
Papillenkarcinome	39 (40,6 %)	57 (59,4 %)	96 (100,0 %)
Dünndarmkarzinome	6 (28,6 %)	15 (71,4 %)	21 (100,0 %)
Alle Karzinome	45 (38,5 %)	72 (81,5 %)	117 (100,0 %)

Tabelle 15: p16^{INK4a}-Signalverlust bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen; p=0,335

Papillenkarcinome	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
De-novo-Ca	20 (45,5 %)	24 (54,5 %)	44 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	19 (36,5 %)	33 (63,5 %)	52 (100,0 %)
Gesamt	39 (40,6 %)	57 (59,4 %)	96 (100,0 %)

Tabelle 16: p16^{INK4a}-Signalverlust bei Papillenkarcinomen; p=0,410

Dünndarmkarzinome	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
De-novo-Ca	1 (9,1 %)	10 (90,9 %)	11 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	5 (50,0 %)	5 (50,0 %)	10 (100,0 %)
Gesamt	6 (28,6 %)	15 (71,4 %)	21 (100,0 %)

Tabelle 17: p16^{INK4a}-Signalverlust bei Dünndarmkarzinomen; p=0,063

3.2.4 P16^{INK4a}-Signalverlust und histologische Subtypen

Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Signalverlust und histologischen Subtypen von **Papillen-** (p=0,110; n=96; Tabelle 18) oder **Dünndarmkarzinomen** (p=0,442; n=21; Tabelle 19).

Histologischer Subtyp	p16 ^{INK4a} -Signalverlust		
	Nein	Ja	Gesamt
Intestinal	27 (57,5 %)	20 (42,5 %)	47 (100,0 %)
intestinal-muzinös	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	8 (100,0 %)
Pankreatobiliär	8 (42,2 %)	11 (57,9 %)	19 (100,0 %)
G3-Adenokarzinom	8 (57,1 %)	6 (42,9 %)	14 (100,0 %)
invasiv-papillär	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	8 (100,0 %)
Gesamt	57 (59,4 %)	39 (40,6 %)	96 (100,0 %)

Tabelle 18: p16^{INK4a}-Signalverlust in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp bei Papillenkarcinomen; p=0,110

Histologischer Subtyp	p16 ^{INK4a} -Signalverlust		
	Nein	Ja	Gesamt
Intestinal	9 (60,0 %)	6 (40,0 %)	15 (100,0 %)
Intestinal-muzinös	3 (100,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)
G3-Adenokarzinom	3 (100,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	15 (71,4 %)	6 (28,6 %)	21 (100,0 %)

Tabelle 19: p16^{INK4a}-Signalverlust in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp bei Dünndarmkarzinomen; p=0,442

3.2.5 P-16^{INK4a}-Verlust und Überleben

Bei Patienten mit Papillen- und Dünndarmkarzinomen bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Signalverlust und ihrem Überleben. **Papillenkarzinompatienten** (Abbildung 15) lebten bei nachgewiesenem p16^{INK4a}-Verlust mit durchschnittlich 50,4 Monate (CI 95: 33,4-67,2) tendenziell kürzer als ohne p16^{INK4a}-Verlust (77,6 Monate (CI 95: 55,5-99,6; p=0,376, n=79). Bei **Dünndarmkarzinompatienten** (Abbildung 16) mit p16^{INK4a}-Verlust betrug das mittlere Überleben 68,0 Monate (CI 95: 15,2-120,8) gegenüber 104,2 Monaten (CI 95: 71,0-137,5) ohne p16^{INK4a}-Verlust (p=0,434; n=11).

3.2.6 p16^{INK4a}-Signalverlust und klinisch-pathologische Variablen

Bei **Papillenkarzinomen** bestanden kein signifikanten Zusammenhänge von p16^{INK4a}-Signalverlust mit **Grading** (p=0,675, n=96), **pT-Stadium** (p=0,605, n=96), **pN-Status** (p=1,00, n=92) und **UICC-Stadium** (p=0,827, n=93). Auch bei **Dünndarmkarzinomen** war keine Assoziation von p16^{INK4a}-Signalverlust mit **Grading** (p=1,000; n=20), **pT-Stadium** (p=1,000; n=20), **pN-Status** (p=1,000; n=20) und **UICC-Stadium** (p=0,088; n=17) feststellbar.

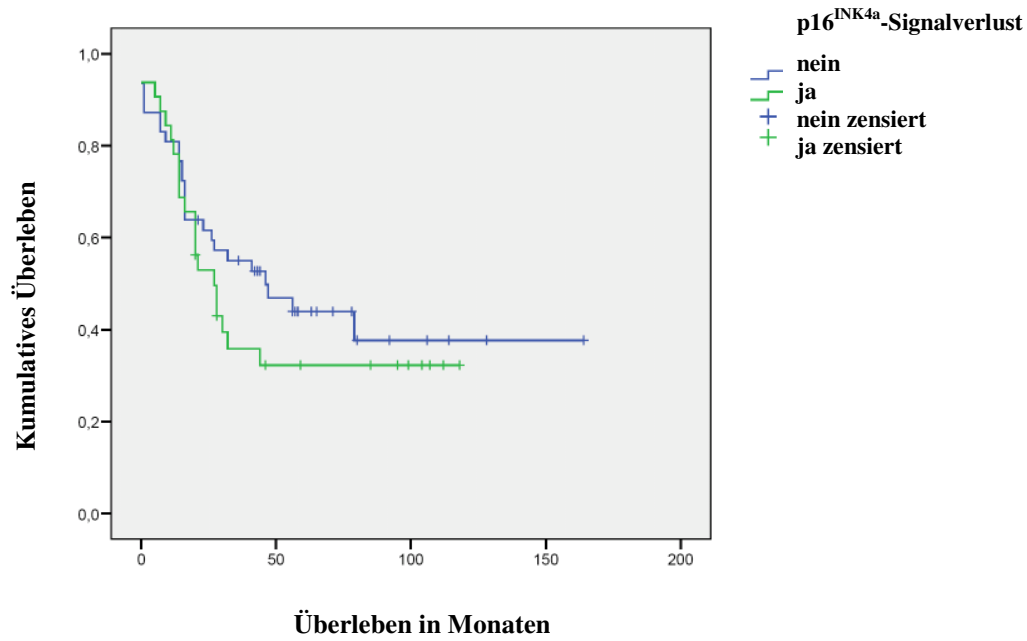


Abbildung 15: Gesamtüberleben von Patienten mit Papillenkarcinom in Abhängigkeit vom p16^{INK}-Status; p=0,367; n=79

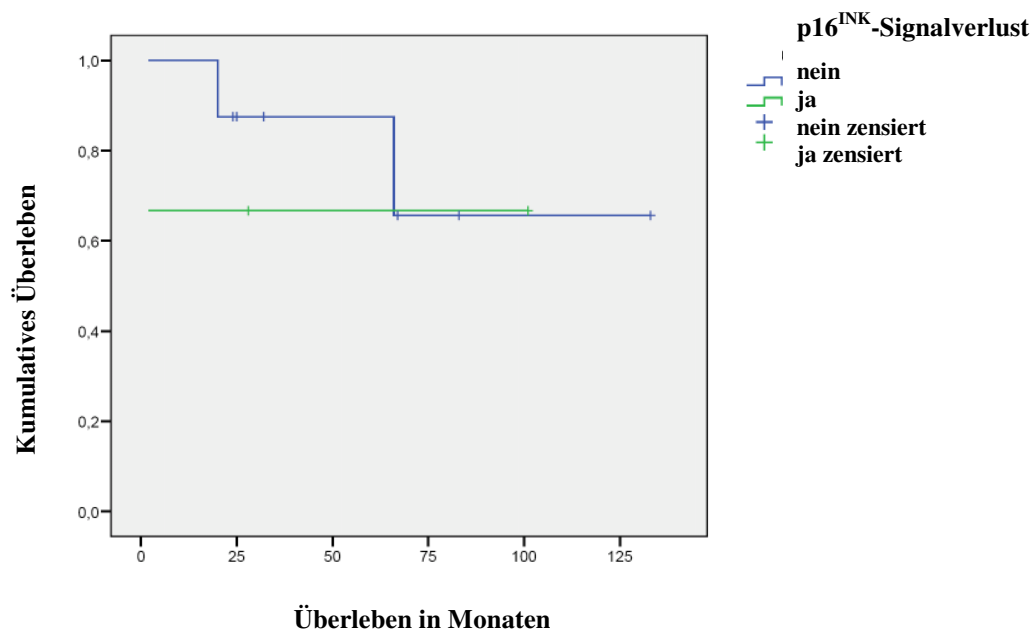


Abbildung 16: Gesamtüberleben von Patienten mit Dünndarmkarcinom in Abhängigkeit vom p16^{INK}-Status; p=0,694; n=11

3.3 MSI-ANALYSE

3.3.1 Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen

Bei den Berechnungen der Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen wurden für die einzelnen Marker die 5 Gruppen LOH, ROH (Retention of Heterozygosity: informative mikrosatellitenstabile Fälle), MSS, NI (nicht-informative Fälle) und MSI (mikrosatelliteninstabile Fälle) unterschieden. Zur Berechnung der Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem der beiden verwendeten Marker wurden nur die Gruppen LOH, ROH und MSI berücksichtigt. Bei sog. dichotomen Berechnungen wurden nur LOH und ROH miteinander verglichen.

Für den Marker pky11 (Tabelle 20) konnten bei 134, für den Marker D9S304 (Tabelle 21) bei 139 **Papillenkarzinomen** erfolgreich MSI-Analysen durchgeführt werden. LOH traten bei Ex-Adenom-Karzinomen signifikant ($p=0,042$; $n=133$) häufiger auf. Insgesamt zeigten 15,0 % der Papillenkarzinome LOH in mindestens einem der Marker (Tabelle 22). Die MSI-Analysen bei **Dünndarmkarzinomen** konnten für den Marker pky11 in 29 Fällen und für D9S304 in 28 Fällen erfolgreich durchgeführt werden (Tabelle 23 und Tabelle 24). Die Häufigkeit von LOH in mindestens einem Marker betrug 21,4 %. Zwischen **De-novo- und Ex-Adenom-Karzinomen** bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede (pky11: $p=0,844$; $n=28$, D9S304: $p=0,400$; $n=29$; Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem der beiden Marker: $p=0,868$; $n=28$, Tabelle 25). Die Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem Primer bei **Papillen- und Dünndarmkarzinomen** unterschied sich hochsignifikant ($p=0,004$; $n=161$)

De-novo-Karzinome von Papille (LOH in mindestens 1 Marker: 7,7 %) und Dünndarm (LOH in mindestens 1 Marker: 18,6 %,) unterschieden sich signifikant ($p=0,007$; $n=81$) im Gegensatz zu **Ex-Adenom-Karzinomen** ($p=0,192$; $n=80$; Papille: 22,1 % LOH in mindestens 1 Marker, Dünndarm: 25,0 % LOH in mindestens 1 Marker).

Papillenkarcinome	D9S304				
	ROH	MSI	LOH	MSS, NI	Gesamt
De-novo-Ca	49 (75,4 %)	7 (10,8 %)	1 (1,5 %)	8 (12,3 %)	65 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	52 (70,3 %)	4 (5,4 %)	5 (6,8 %)	13 (17,6 %)	74 (100,0 %)
Gesamt	101 (72,7 %)	11 (7,9 %)	6 (4,3 %)	21 (15,1 %)	139 (100,0%)

Tabelle 20: Papillenkarcinome: Mikrosatellitenalterationen in D9S304; p=0,274

Papillenkarcinome	Pky 11				
	ROH	MSI	LOH	MSS, NI	Gesamt
De-novo-Ca	31 (50,8 %)	1 (1,6 %)	4 (6,6 %)	25 (41,0 %)	61 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	31 (42,5 %)	1 (1,4 %)	12 (16,4 %)	29 (29 %)	73 (73,0 %)
Gesamt	63 (46,3 %)	2 (1,5 %)	16 (11,9 %)	54 (40,3 %)	134 (100,0 %)

Tabelle 21: Papillenkarcinome: Mikrosatellitenalterationen in pky11; p=0,306

Papillenkarcinome	Mikrosatellitenalteration in mindestens 1 Marker			
	ROH	MSI	LOH	Gesamt
De-novo-Ca	53 (81,5 %)	7 (10,8 %)	5 (7,7 %)	65 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	50 (73,5 %)	3 (4,4 %)	15 (22,1 %)	68 (100,0 %)
Gesamt	103 (77,4 %)	10 (7,5 %)	20 (15,0 %)	133 (100,0 %)

Tabelle 22: Papillenkarcinome: Mikrosatellitenalteration in mindestens einem der Marker D9S304 und pky11; p=0,042

Dünndarmkarzinome	D9S304				
	ROH	MSI	LOH	MSS, NI	Gesamt
De-novo-Ca	6 (37,5 %)	6 (37,5 %)	2 (12,5 %)	2 (12,5 %)	16 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	6 (50,0 %)	1 (8,3 %)	3 (25,0 %)	2 (16,7 %)	12 (100,0 %)
Gesamt	12 (17,9 %)	7 (25,0 %)	5 (17,9 %)	4 (14,3 %)	28 (100,0 %)

Tabelle 23: Dünndarmkarzinome: Mikrosatellitenalterationen in D9S304; p=0,844

Dünndarmkarzinome	pky11				
	ROH	MSI	LOH	MSS, NI	Gesamt
De-novo-Ca	8 (47,1 %)	3 (15,6 %)	2 (11,8 %)	4 (23,5 %)	17 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	5 (41,7 %)	1 (8,3 %)	1 (8,3 %)	5 (41,7 %)	12 (100,0 %)
Gesamt	13 (44,8 %)	4 (13,8 %)	3 (10,3 %)	9 (31,0 %)	29 (100,0 %)

Tabelle 24: Dünndarmkarzinome: Mikrosatellitenalterationen in pky 11; p=0,400

Dünndarmkarzinome	Mikrosatellitenalteration in mindestens 1 Marker			
	ROH	MSI	LOH	Gesamt
De-novo-Ca	7 (43,8 %)	6 (37,5 %)	3 (18,8 %)	16 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	7 (58,3 %)	2 (16,7 %)	3 (25,0 %)	12 (100,0 %)
Gesamt	14 (50,0 %)	8 (28,6 %)	6 (21,4 %)	28 (100,0 %)

Tabelle 25: Dünndarmkarzinome: Mikrosatellitenalteration in mindestens einem der Marker D9S304 und pky11; p=0,868

3.3.2 Mikrosatellitenalterationen und histologische Subtypen

Tabelle 26 bis Tabelle 29 zeigen die Häufigkeitsverteilung von Mikrosatellitenalterationen bei **Papillenkarcinomen** in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp. LOH war am häufigsten bei invasiv-papillären Karzinomen, gefolgt von intestinal-muzinösen, intestinalen, pankreatobiliären und G3-Adenokarcinomen. Während für den Marker pky 11 kein statistisch signifikanter Zusammenhang bestand ($p=0,142$), wurde für Marker D9S304 das Signifikanz-Niveau mit $p=0,014$ erreicht. Auch bei Alteration in mindestens einem der beiden Marker ($p=0,010$) und bei dichotomer Berechnung LOH/ROH ($p=0,005$) war der Zusammenhang signifikant. Der Vergleich intestinaler und intestinal-muzinöser Karzinome mit pankreatobiliären, G3-Adenokarcinomen oder Kombinationen von pankreatobiliären, G3-Adenokarcinomen und invasiv-papillären Karzinomen lieferte z.T. in mehreren Berechnungen signifikante Unterschiede (Tabelle 30).

Zwischen dem **histologischen Subtyp von Dünndarmkarzinomen** und dem Mikrosatellitenstatus war hingegen kein Zusammenhang nachweisbar (Tabelle 31 bis Tabelle 34).

Pky11	Histologischer Subtyp					
	Intestinal	Intestinal-muzinös	Pankreatobiliär	G3-Adenokarzinom	Invasiv papillär	Gesamt
ROH	29 (45,3 %)	5 (41,75 %)	17 (60,7 %)	9 (42,9 %)	2 (22,2 %)	62 (46,3 %)
MSI	1 (1,6 %)	1 (8,35 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (1,5 %)
LOH	9 (14,1 %)	3 (25,0 %)	2 (7,1 %)	0 (0,0 %)	2 (22,2 %)	16 (11,9 %)
ROH	25 (39,1 %)	3 (25,0 %)	9 (32,1)	12 (57,1 %)	5 (55,6 %)	54 (40,3 %)
GESAMT	64 (100,0 %)	12 (100,0 %)	28 (100,0 %)	21 (100,0 %)	9 (100,0,%)	134 (100,0 %)

Tabelle 26: Papillenkarcinome: Mikrosatellitenalterationen in pky11 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; $p=0,142$

D9S304	Histologischer Subtyp					
	Intestinal	Intestinal-muzinös	Pankreato-biliär	G3-Adeno-Karzinom	Invasiv papillär	Gesamt
ROH	40 (63,5 %)	8 (61,5 %)	29 (87,9 %)	18 (85,7 %)	6 (66,7 %)	101 (72,7 %)
MSI	6 (9,5 %)	1 (7,75 %)	3 (9,1 %)	0 (0,0 %)	1 (11,1 %)	11 (7,9 %)
LOH	2 (3,2 %)	2 (15,4 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (22,2 %)	6 (4,3 %)
MSS, NI	15 (23,8 %)	15 (23,8 %)	1 (3,0 %)	3 (14,3 %)	0 (0,0 %)	21 (15,1 %)
GESAMT	63 (100,0 %)	13 (100,0 %)	33 (100,0 %)	21 (100,0 %)	9 (100,0 %)	139 (100,0 %)

Tabelle 27: Papillenkarcinome: Mikrosatellitenalterationen in D9S304 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,014

Alteration in mindestens einem der Marker	Histologischer Subtyp					
	Intestinal	Intestinal-muzinös.	Pankreato-biliär	G3-Adeno-Karzinom	Invasiv Papillär	Gesamt
ROH	44 (73,3 %)	7 (58,3 %)	29 (87,9 %)	19 (100,0 %)	4 (44,4 %)	103 (77,4 %)
MSI	5 (8,3 %)	2 (16,7 %)	2 (6,1 %)	0 (0,0 %)	1 (11,1 %)	10 (7,5 %)
LOH	11 (18,3 %)	3 (25,0 %)	2 (6,1 %)	0 (0,0 %)	4 (44,4 %)	20 (15,0 %)
GESAMT	60 (100,0 %)	12 (100,0 %)	33 (100,0 %)	19 (100,0 %)	9 (100,0 %)	133 (100,0 %)

Tabelle 28: Papillenkarcinome: Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem der Marker D9S304 und pky 11 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,010

LOH in mindestens einem der Marker	Histologischer Subtyp					
	Intestinal	Intestinal- mucinös.	Pankreato- biliär	G3-Adeno- Karzinom	Invasiv- papillär	Gesamt
ROH	47 (81,0 %)	6 (72,7 %)	29 (93,5 %)	19 (100,0 %)	4 (50,0 %)	107 (84,3 %)
LOH	11 (19,0 %)	3 (27,3 %)	2 (6,5 %)	0 (0,0 %)	(50,0 %)	20 (15,7 %)
GESAMT	58 (100,0 %)	11 (100,0 %)	31 (100,0 %)	19 (100,0 %)	(100,0 %)	127 (100,0 %)

Tabelle 29: Papillenkarcinome: LOH in mindestens einem der Marker pky11 und D9S304 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,005

histologischer Subtyp (gruppiert)	Signifikanzniveau für			
	Pky 11	D9S304	Alteration in mindestens 1 Marker	LOH in mindestens 1 Marker
Intestinal+ int.-mucinös vs. Pankreatobiliär vs. G3-Adeno-Ca+ invas.- papillär	0,286	0,053	0,345	0,223
Intestinal+ int.-mucinös vs. Pankreatobiliär	0,452	0,021	0,128	0,138
Intestinal + int.-mucinös vs. G3-Adeno-Ca	0,138	0,267	0,021	0,034
Intestinal + int.-mucinös vs. Pankreatob. + G3-Adeno-Ca + inv-pap	0,243	0,028	0,143	0,148

Tabelle 30: Papillenkarcinome: Korrelation zwischen histologischen Subtypen und Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem der Marker pky11 und D9S304 (p-Werte).

Pky11	Histologischer Subtyp			
	Intestinal	Intestinal-muzinös	G3-Adeno-Karzinom	Gesamt
ROH	10 (47,6 %)	1 (25,0 %)	1 (33,3 %)	12 (100,0 %)
MSI	3 (14,3 %)	1 (25,0 %)	0 (0,0 %)	4 (100,0 %)
LOH	1 (4,8 %)	1 (25,0 %)	1 (33,3 %)	3 (100,0 %)
MSS, NI	7 (33,3 %)	1 (25,0 %)	1 (33,3 %)	9 (100,0 %)
GESAMT	21 (100,0 %)	4 (100,0 %)	3 (100,0 %)	28 (100,0 %)

Tabelle 31: Dünndarmkarzinome: Mikrosatellitenalterationen in pky 11 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,061

D9S304	Histologischer Subtyp			
	Intestinal	Intestinal-muzinös	G3-Adeno-Karzinom	Gesamt
ROH	9 (42,9 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	11 (40,7 %)
MSI	4 (19,0 %)	2 (66,6 %)	1 (33,3 %)	7 (25,9 %)
LOH	4 (19,0 %)	0 (0,0 %)	1 (33,3 %)	5 (18,5 %)
MSS, NI	4 (19,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	4 (14,8 %)
GESAMT	21 (100,0 %)	3 (100,0 %)	3 (100,0 %)	27 (100,0 %)

Tabelle 32: Dünndarmkarzinome: Mikrosatellitenalterationen in D9S304 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,738

Alteration in mindestens 1 Marker	Histologischer Subtyp			
	Intestinal	Intestinal- muzinös	G3-Adeno- Karzinom	Gesamt
ROH	12 (57,1 %)	0 (0,0 %)	1 (33,3 %)	13 (48,1 %)
MSI	5 (23,8 %)	2 (66,6 %)	1 (33,3 %)	8 (29,6 %)
LOH	4 (19,0 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	6 (22,2 %)
GESAMT	21 (100,0 %)	3 (100,0 %)	3 (100,0 %)	27 (100,0 %)

Tabelle 33: Dünndarmkarzinome: Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem der Marker pky 11 und D9S304 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,285

LOH in mindestens 1 Marker	Histologischer Subtyp			
	Intestinal	Intestinal- muzinös	G3-Adeno- Karzinom	Gesamt
ROH	12 (75,0 %)	0 (0,0 %)	1 (50,0 %)	13 (68,4 %)
LOH	4 (25,0 %)	1 (100,0 %)	1 (50,0 %)	6 (31,6 %)
GESAMT	16 (100,0 %)	1 (100,0 %)	2 (100,0 %)	19 (100,0 %)

Tabelle 34: Dünndarmkarzinome: LOH in mindestens einem der Marker pky 11 und D9S304 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp; p=0,222

3.3.3 Mikrosatellitenalterationen und Überleben

Die Kaplan-Meier-Analysen bei **Papillen-** (Tabelle 35; Abbildung 17) und **Dünndarmkarzinomen** (Abbildung 18) ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Mikrosatellitenalterationen und dem Überleben. Bei Dünndarmkarzinomen konnten keine Mittelwerte errechnet werden, da alle Fälle zensiert waren.

Berechnung		Mittleres Überleben			
		Anzahl	Mittelwert (Mon)	CI 95	
pky11	ROH	10	54,729	41,322	68,135
	MSI	2	67,000	32,352	101,648
	LOH	42	65,600	33,320	97,880
	ROH	40	55,949	40,525	71,373
	Gesamt	94	63,036	51,635	74,437
D9S304	ROH	4	56,318	43,181	69,454
	MSI	8	45,125	19,447	70,803
	LOH	69	48,000	9,461	86,539
	ROH	15	59,133	39,498	78,768
	Gesamt	96	58,856	47,835	69,878
Mikrosatelliten- Alteration in mindestens 1 Marker	ROH	71	50,218	39,092	61,344
	MSI	9	44,778	21,944	67,612
	LOH	12	67,250	37,669	96,831
	Gesamt	92	56,944	45,620	96,831
LOH mindestens 1 Marker	ROH	74	50,309	39,477	61,142
	LOH	12	67,250	37,669	96,831
	Gesamt	86	56,994	45,235	68,753

Tabelle 35: Mittelwerte und Konfidenzintervall 95 für das Überleben von Patienten mit Papillenkarcinomen in Anhängigkeit von Mikrosatellitenstatus in mindestens 1 der Marker D9S304 und pky11 (CI 95: Konfidenzintervall 95, Mon: Monate)

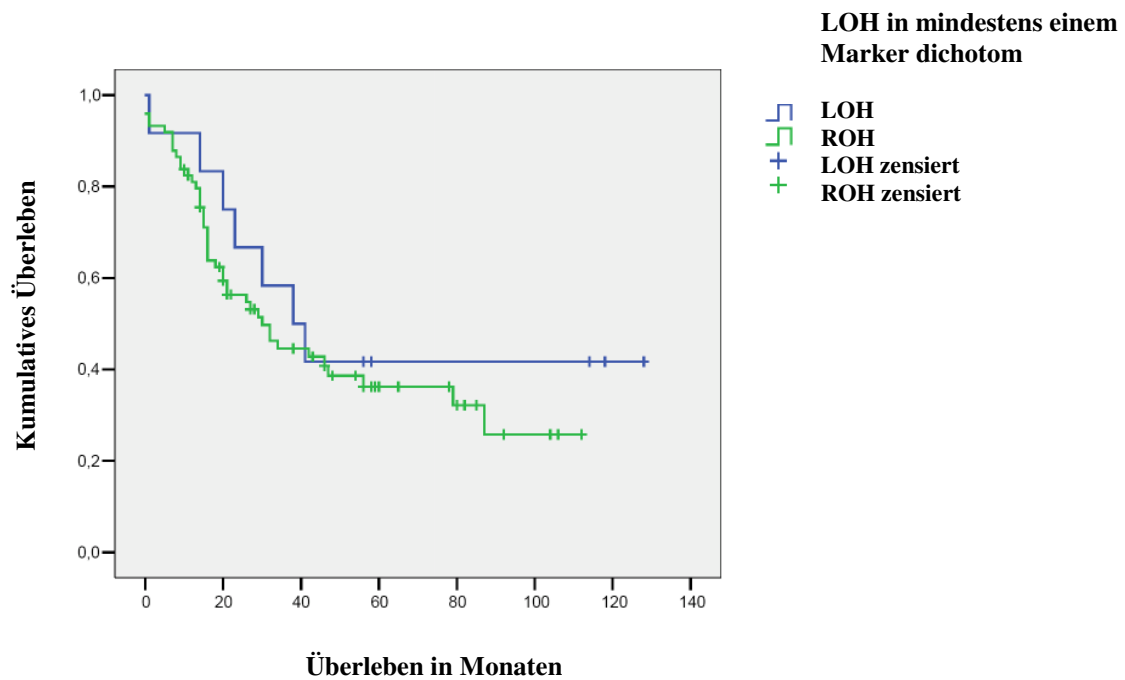


Abbildung 17: Gesamtüberleben von Patienten mit Papillenkarzinomen in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus; n=86; p=0,441

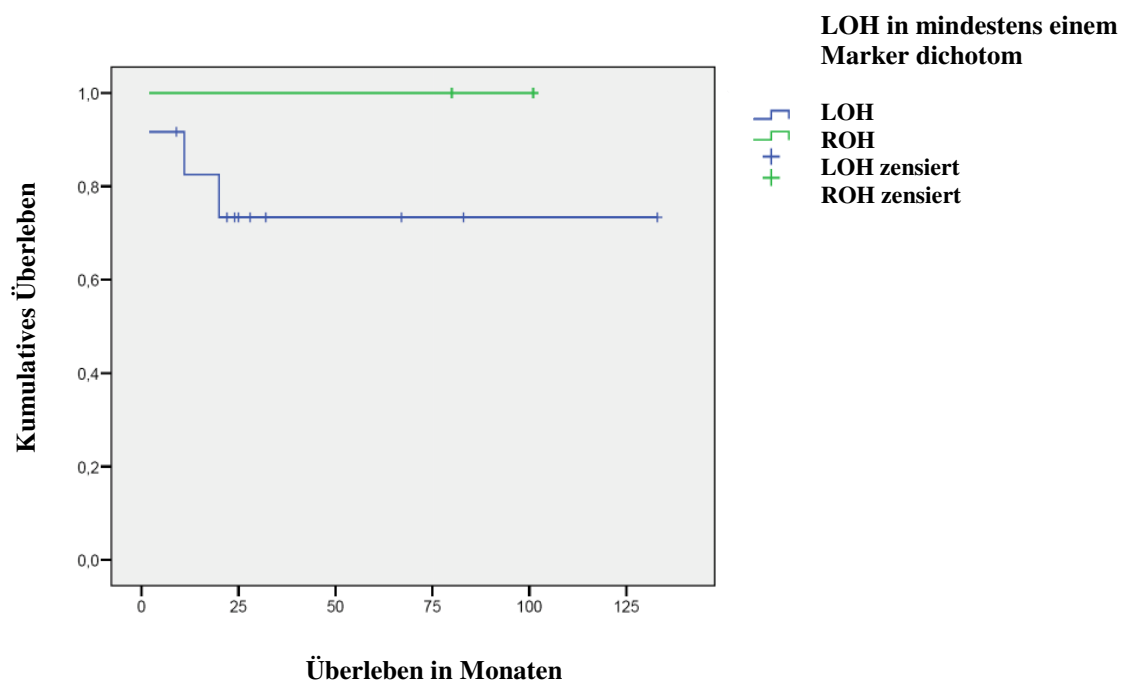


Abbildung 18: Gesamtüberleben von Patienten mit Dünndarmkarzinomen in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus; n=11; p=0,443

3.3.4 Mikrosatellitenalterationen und klinisch-pathologische Variablen

Bei **Papillenkarcinomen** konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Mikrosatellitenalterationen und **Grading** festgestellt werden (pky11: $p=0,592$, $n=132$; D9S304: $p=0,666$, $n=135$; Alteration in mindestens 1 Marker: $p=1,000$, $n=129$; LOH in mindestens 1 Marker: $p=0,365$, $n=124$). Auch bei den **Dünndarmkarcinomen** bestanden keine Korrelationen von Mikrosatellitenstatus und **Grading** ($p=0,859$; $n=25$ für Mikrosatellitenalteration bei Marker pky 11; $p=0,845$; $n=24$ bei Marker D9S304 und $p=1,000$; $n=24$ bei Mikrosatellitenalteration in einem der Marker).

Bei **Papillenkarcinomen** konnte kein Zusammenhang von **pT-Stadium** und Mikrosatellitenalterationen nachgewiesen werden (pky11: $n=133$; $p=0,839$ für alle Stadien und $p=0,700$ für pT1+2 vs. pT3+4; D9s304: $n=136$; $p=0,634$ für alle Stadien und $p=0,163$ für pT1+2 vs. pT3+4; Alteration in mindestens 1 Marker: $n=130$; $p=0,384$ für alle Stadien und $p=0,116$ für pT1+2 vs. pT3+4; LOH in mindestens 1 Marker: $n=125$; $p=0,388$ für alle Stadien). Auch **Dünndarmkarcinome** zeigten keine signifikante Korrelation zwischen Mikrosatellitenalteration und **pT-Stadium** (pky11: $p=0,581$, $n=25$, D9S304: $p=0,771$, $n=24$ und Mikrosatellitenalteration in mindestens einem Marker $p=0,429$, $n=24$).

Der **pN-Status** von **Papillenkarcinomen** (LOH in mindestens einem Marker: $p=0,282$; $n=115$) und **Dünndarmkarcinomen** (pky 11: $p=0,245$; $n=21$, D9S304: $p=0,634$; $n=20$, Mikrosatellitenalteration in mindestens einem Marker: $p=0,634$; $n=20$, dichotome Berechnung für Mikrosatellitenalteration in mindestens einem der Marker: $n=14$; $p=1,000$) stand in keinem signifikanten Zusammenhang mit dem Mikrosatellitenstatus.

Statistisch signifikante Zusammenhänge von Mikrosatellitenalterationen mit **UICC-Stadium** (gruppiert; IA-IIA vs. IIB vs. III-IV) bestanden weder bei Papillenkarcinomen (pky11: $p=0,701$, $n=123$; D9S304: $p=0,690$; $n=126$, Alteration in mindestens einem der Marker: $p=0,561$; $n=121$; LOH in mindestens einem Marker: $p=0,526$, $n=116$) noch bei **Dünndarmkarcinomen** ($p=0,489$, $n=22$ bei Marker D9S304, Tabelle 36, $p=0,057$; $n=23$ für Marker pky 11, Tabelle 37, $p=0,055$; $n=23$ für Mikrosatellitenalteration in mindestens einem der Marker; $p=0,064$; $n=18$ für LOH in mindestens einem der Marker, Tabelle 38).

UICC-Stadium	D9S304				
	ROH	MSI	LOH	ROH	Gesamt
Stadium I	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)
Stadium II	4 (57,1 %)	1 (14,3 %)	1 (14,3 %)	1 (14,3 %)	7 (100,0 %)
Stadium III	2 (22,2 %)	5 (55,6 %)	1 (11,1 %)	1 (11,1 %)	9 (100,0 %)
Stadium IV	1 (33,3 %)	0 (0,0 %)	2 (66,7 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	8 (36,4 %)	7 (31,8 %)	5 (22,7 %)	2 (9,1 %)	22 (100,0 %)

Tabelle 36: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen des Markers D9S304 in Abhängigkeit vom UICC-Stadium; p=0,489

UICC-Stadium	Pky 11				
	ROH	MSI	LOH	ROH	Gesamt
Stadium I	0 (0,0 %)	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
Stadium II	6 (75,0 %)	0 (0,0 %)	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	8 (100,0 %)
Stadium III	3 (30,0 %)	2 (20,0 %)	0 (0,0 %)	5 (50,0 %)	10 (100,0 %)
Stadium IV	1 (33,3 %)	0 (0,0 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	10 (43,5 %)	3 (13,0 %)	3 (13,0 %)	7 (30,4 %)	23 (100,0 %)

Tabelle 37: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen des Markers pky 11 in Abhängigkeit vom UICC-Stadium; p=0,057

UICC-Stadium	Mikrosatellitenalteration in mindestens 1 Marker			
	ROH	MSI	LOH	Gesamt
Stadium I	0 (0,0 %)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (100,0 %)
Stadium II	6 (75,0 %)	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	8 (100,0 %)
Stadium III	3 (33,3 %)	5 (55,6 %)	1 (11,1 %)	9 (100,0 %)
Stadium IV	1 (33,3 %)	0 (0,0 %)	2 (66,7 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	10 (43,5 %)	7 (30,4 %)	6 (26,1 %)	23 (100,0 %)

Tabelle 38: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen in mindestens einem der Marker pky 11 und D9S304 in Abhängigkeit vom UICC-Stadium; p=0,055

3.3.5 **p16^{INK4a}-Signalverlust und Mikrosatellitenalteration**

Insgesamt wurden Deletionen des Chromosomenabschnitts 9p häufiger in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Papille: 40,6 %, Dünndarm: 28,6 %) als in der MSI-Analyse (Papillenkarzinome: 15,0 %; Dünndarmkarzinome 21,4 %) gefunden. Bei genauer Betrachtung der einzelnen Entitäten zeigen sich bei beiden Methoden teils sehr unterschiedliche bzw. sogar entgegengesetzte Ergebnisse (Tabelle 39). Bei **Papillenkarzinomen** zeigte die FISH einen häufigeren 9p-Verlust in der Gruppe der De-novo-Karzinome (45,5 % vs. 36,5 %; $p=0,41$; $n=96$), während in der MSI-Analyse 9p-Verlust signifikant häufiger in der Gruppe der Ex-Adenom-Karzinome (22,1 % vs 7,7 %; $p=0,042$; $n=133$) vorkam. Ein genau umgekehrtes Bild ergab sich bei den **Dünndarmkarzinomen**: hier war ein 9p-Verlust in der FISH tendenziell häufiger bei Ex-Adenom-Karzinomen (50,0 % vs 9,1 %; $p=0,063$; $n=21$), während ein 9p-Verlust in der MSI-Analyse etwas häufiger bei den De-novo-Karzinomen vorkam (18,8 % vs 25,0 %; $p=0,868$; $n=28$). In der Gruppe aller **De-novo-Karzinome** zeigte sich ebenfalls, dass bei FISH-Analysen 9p-Verlust signifikant häufiger bei Papillenkarzinomen (45,5 % vs. 9,1 %; $p=0,037$; $n=55$), in der MSI-Analyse signifikant häufiger bei den Dünndarmkarzinomen (19,8 % vs 7,7 %; $p=0,007$; $n=81$) auftrat. In der Gruppe der **Ex-Adenom-Karzinome** war in der FISH 9p-Verlust häufiger bei Dünndarmkarzinomen (50,0 % vs 36,5 %; $p=0,323$; $n=62$). In der MSI-Analyse wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen Papillen- und Dünndarmkarzinomen festgestellt (22,1 % vs 25,0 %; $p=0,192$; $n=80$).

Die Korrelationsanalyse zeigte ebenfalls Unterschiede bei den Ergebnissen von FISH- und MSI-Analyse. Bei **Papillenkarzinomen** waren LOH und p16^{INK4a}-Signalverlust nur in einem geringen Prozentsatz der Fälle gleichzeitig feststellbar. Es konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen p16^{INK4a}-Verlust in der FISH und LOH in der MSI-Analyse nachgewiesen werden (Tabelle 40 bis Tabelle 43). **Dünndarmkarzinome** mit LOH in der MSI-Analyse zeigten in der FISH etwas häufiger als Papillenkarzinome gleichzeitig einen p16^{INK4a}-Signalverlust. Es bestand jedoch ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang (Tabelle 44 bis Tabelle 47).

Karzinome		P16 ^{INK4a} -Signalverlust			LOH in mindestens 1 Marker		
		N	%	p	p	%	n
De-novo-	Papillenkarcinome	44	45,5	<u>0,037</u>	<u>0,007</u>	7,7	65
	Dünndarmkarcinome	11	9,1			19,8	16
Ex-Adenom-	Papillenkarcinome	52	36,5	0,323	0,192	22,1	68
	Dünndarmkarcinome	10	50,0			25,0	12
De-novo-	Papillenkarcinome	44	45,5	0,41	<u>0,042</u>	7,7	65
Ex-adeno		52	36,5			22,1	68
De-novo-	Dünndarmkarcinome	11	9,1	<u>0,063</u>	<u>0,004</u>	25,0	16
Ex-Adenom-		10	50,0			18,8	12

Tabelle 39: Häufigkeit von 9p-Verlust in FISH und MSI-Analyse

Pky 11	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	21 (60,0 %)	14 (40,0 %)	35 (100,0 %)
MSI	1 (40,0 %)	0 (60,0 %)	1 (100,0 %)
LOH	7 (57,1 %)	3 (42,8 %)	10 (100,0 %)
MSS, NI	18 (54,5 %)	15 (45,5 %)	33 (100,0 %)
Gesamt	47 (59,5 %)	32 (40,5 %)	79 (100,0 %)

Tabelle 40: Papillenkarcinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von Alteration in pky11; p=0,970

D9S304	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	33 (55,9 %)	26 (44,1 %)	59 (100,0 %)
MSI	5 (55,6 %)	4 (44,4 %)	9 (100,0 %)
LOH	4 (100,0 %)	0 (0,0 %)	4 (100,0 %)
MSS, NI	4 (44,4 %)	5 (55,6 %)	9 (100,0 %)
Gesamt	46 (56,7 %)	35 (43,2 %)	81 (100,0 %)

Tabelle 41: Papillenkzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von Alteration in D9S304; p=0,351

Alteration in mind. 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	34 (56,7 %)	26 (43,3 %)	60 (100,0 %)
MSI	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)	7 (100,0 %)
LOH	9 (75,0 %)	3 (25,0 %)	12 (100,0 %)
Gesamt	47 (59,5 %)	32 (40,5 %)	79 (100,0 %)

Tabelle 42: Papillenkzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von Alteration in mindestens einem der Marker pky 11 und D9S304; p=0,527

LOH in mind. 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	35 (55,6 %)	28 (44,4 %)	63 (100, %)
LOH	9 (75,0 %)	3 (25,0 %)	12 (100, %)
Gesamt	44 (58,7 %)	31 (41,3 %)	75 (100, %)

Tabelle 43: Papillenkzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von LOH in mindestens einem der Marker pky 11 und D9S306; p=0,338

Pky 11	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)	9 (100,0 %)
MSI	3 (100,0 %)	0 (0,0 %)	3 (100,0 %)
LOH	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	2 (100,0 %)
MSS, NI	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	4 (100,0 %)
Gesamt	13 (72,2 %)	5 (27,7 %)	18 (100,0 %)

Tabelle 44: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von Alteration in Pky11; p=0,782

D9S304	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	5 (55,5 %)	4 (44,4 %)	9 (100,0 %)
MSI	5 (100,0 %)	0 (0,0 %)	5 (100,0 %)
LOH	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (100,0 %)
MSS, NI	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
Gesamt	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)	19 (100,0 %)

Tabelle 45: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von Alteration in D9S304; p=0,142

Alteration in mind.1 Marker	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	6 (60,0 %)	4 (40,0 %)	10 (100,0 %)
MSI	6 (100,0 %)	0 (0,0 %)	6 (100,0 %)
LOH	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	13 (68,4 %)	6 (31,6 %)	19 (100,0 %)

Tabelle 46: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von Alteration in mindestens einem der Marker pky 11 und D9S304; p= 0,095

LOH in mind. 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Verlust		
	Nein	Ja	Gesamt
ROH	7 (63,6 %)	4 (37,4 %)	11 (100,0 %)
LOH	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	8 (57,1 %)	6 (42,9 %)	14 (100,0 %)

Tabelle 47: Dünndarmkarzinome: Anzahl und Häufigkeit eines p16^{INK4a}-Signalverlusts in Abhängigkeit von LOH in mindestens einem der Marker pky11 und D9S304; p=0,538

3.4 METHYLIERUNG

3.4.1 Häufigkeit von Methylierung

Bei einer Auswahl an Karzinomen wurden zusätzlich Methylierungsanalysen durchgeführt. Tabelle 48 zeigt die Ergebnisse der Methylierung für Papillen- und Dünndarmkarzinome.

Methylierung	Papillenkarzinome				Dünndarmkarzinome			
	De-novo-Ca	Ca-ex-Ad	Gesamt		Gesamt		De-novo-Ca	Ca-ex-Ad
Nicht methyliert	5	14	19	79,2 %	14,2 %	1	-	1
Leicht methyliert	-	1	1	4,2 %	0,0 %	-	-	-
Zur Hälfte methyliert	-	2	2	8,3 %	71,4 %	5	4	1
Vollständig methyliert	1	1	2	8,3 %	14,2 %	1	1	-
Gesamt	6	18	24	100 %	100 %	7	5	2

Tabelle 48: Methylierungsstatus von Papillen- und Dünndarmkarzinomen

Die Methylierungsmuster von Papillenkarzinomen und Dünndarmkarzinomen unterschieden sich signifikant ($p=0,002$). Bei Vergleich nicht-/leicht methylierter gegenüber zur Hälfte/vollständig methylierten Karzinomen blieb dieses Signifikanzniveau erhalten ($p=0,002$). Auch bei Vergleich von nicht mit leicht/zur Hälfte/vollständig methylierten Karzinomen blieb der Unterschied mit $p=0,004$ signifikant. Die Methylierungsmuster von Dünndarm- und Papillentumoren zeigten dabei ein inverses Verhalten: bei Papillenkarzinomen war der Großteil der Tumoren nicht oder nur leicht methyliert, während Dünndarmkarzinome überwiegend zur Hälfte oder vollständig methyliert waren (Abbildung 19). Auch Methylierungsstatus und Karzinomentitäten korrelierten signifikant ($p=0,002$; Abbildung 20).

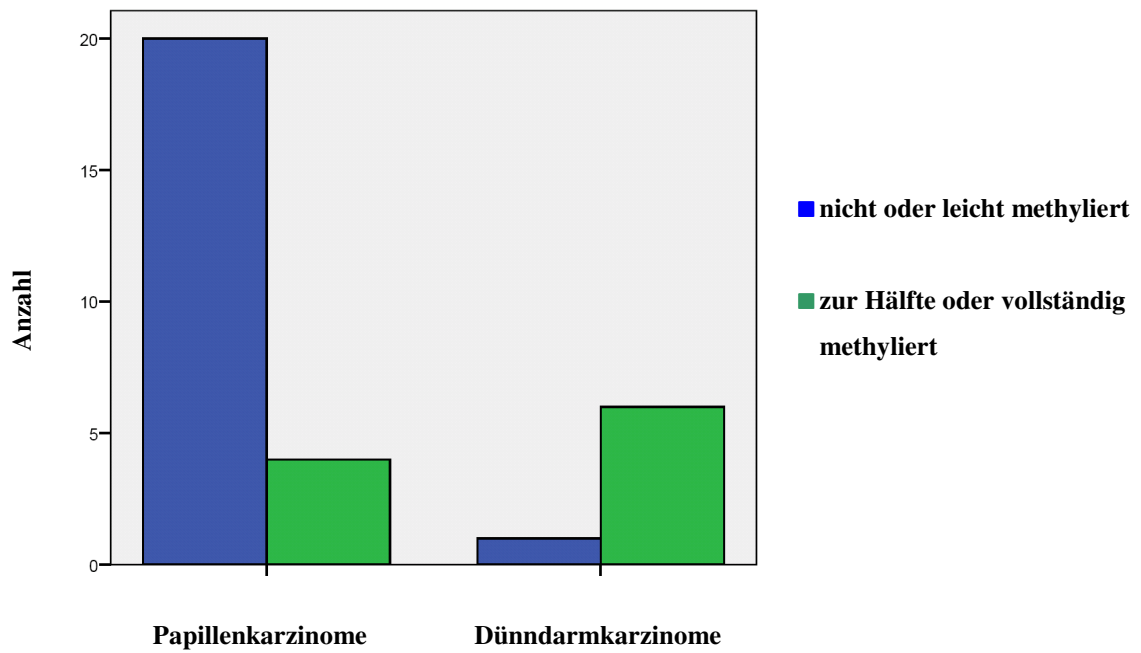


Abbildung 19: Inverses Methylierungsverhältnis von Papillen- und Dünndarmkarzinomen.

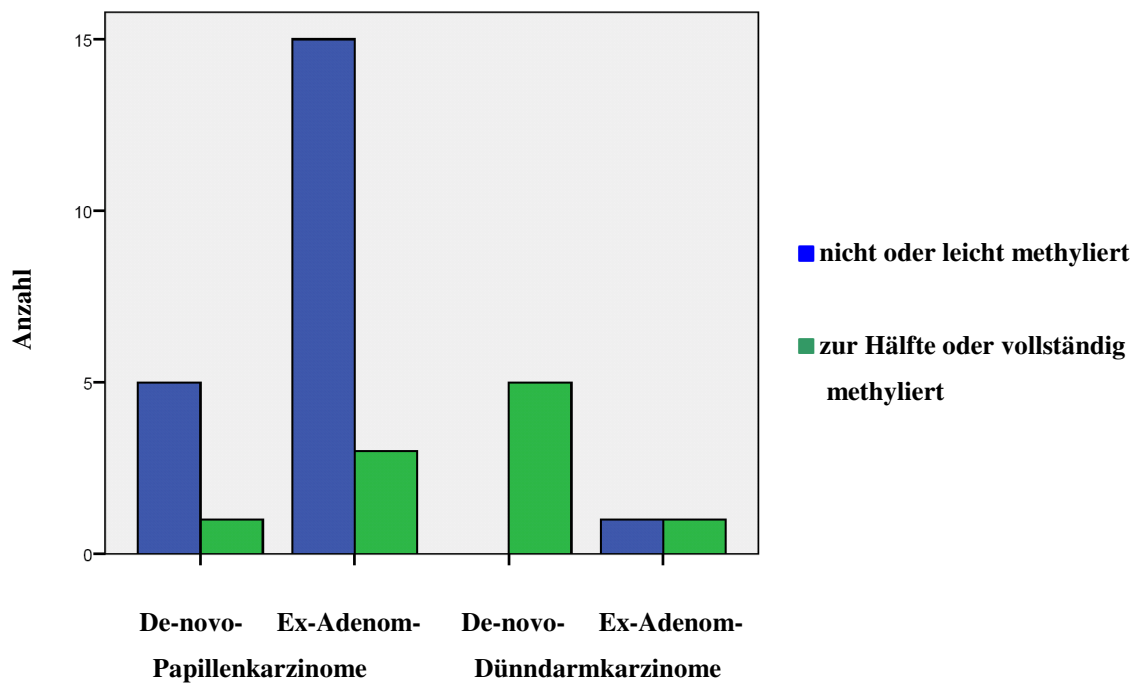


Abbildung 20: Methylierungsstatus von De-novo- und Ex-Adenom-Karzinomen von Papille und Dünndarm

3.4.2 Methylierungs-Status und Überleben

Bei Papillenkarcinomen bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und Überleben ($p=0,075$; $n=19$). Das mittlere Überleben in der Gruppe der nicht oder leicht methylierten Tumoren war mit 73,77 Monate (CI: 58,365-89,169) jedoch tendenziell besser gegenüber 30,75 Monate (CI: 15,172-81,801) halb oder vollständig methylierter Tumore (Abbildung 21). Für Dünndarmkarcinome war wegen einer zu geringen Anzahl an vollständigen Überlebensdaten keine Kaplan-Meier-Analyse möglich.

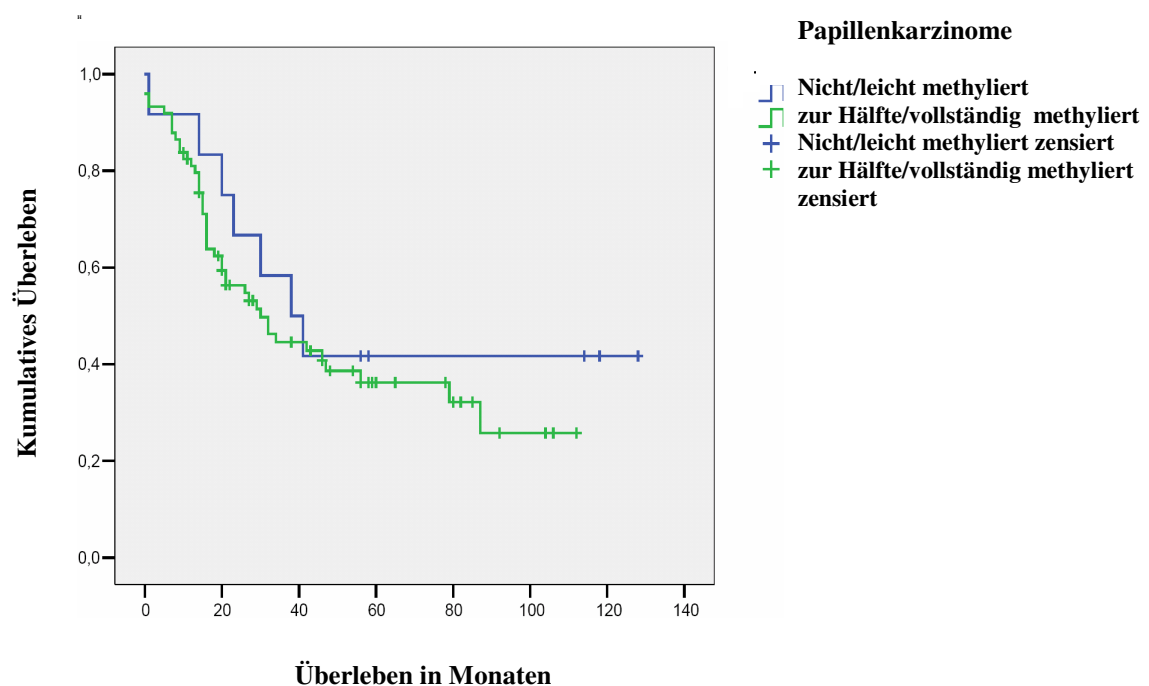


Abbildung 21: Papillenkarcinome: Überleben in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus; $p=0,075$

3.4.3 Methylierungs-Status und klinisch-pathologische Variablen

Bei **Papillen-**($p=0,720$; $n=24$) und **Dünndarmkarzinomen** ($p=1,000$, $n=7$) bestand kein Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und **Grading**. Auch hinsichtlich **pT-Stadium** (Papillenkarzinome: $p=0,595$; $n=24$; Dünndarmkarzinome: $p=1,000$, $n=7$) und **Nodalstatus** (Papillenkarzinome: $p=0,053$; $n=21$; Dünndarmkarzinome: $p=0,524$; $n=7$) war kein Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus feststellbar. Eine Assoziation von Methylierungsstatus und **UICC-Stadium (gruppiert)** bestand ebenfalls nicht (Papillenkarzinome: $p=0,373$, $n=22$, Dünndarmkarzinome: $p=0,429$; $n=7$).

3.4.4 Methylierungs-Status und FISH

Bei **Papillenkarzinomen** konnten MSI-Analyse und FISH an 17 Patienten erfolgreich durchgeführt werden. P16^{INK4a}-Signalverlust und Methylierungs-Status waren voneinander unabhängig ($p=1,000$; $n=17$). Bei **Dünndarmkarzinomen** konnten MSI-Analyse und FISH an 6 Patienten erfolgreich durchgeführt werden. Auch hier bestand kein Zusammenhang ($p=0,600$; $n=6$).

3.4.5 Methylierungs-Status und Mikrosatellitenalterationen

Bei Vergleich der Ergebnisse von MS-PCR und MSI-Analyse zeigten Papillenkarzinome LOH ausschließlich in der Gruppe der nicht methylierten Tumoren. Für die Marker pky11 ($p=0,188$, $n=22$), D9S304 ($p=0,429$; $n=23$) und bei Mikrosatellitenalteration in mindestens einem der beiden Marker ($p=0,463$; $n=22$) bestanden keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 49 bis Tabelle 52). Auch bei **Dünndarmkarzinomen** waren Methylierungsstatus und Mikrosatellitenalterationen voneinander unabhängig (pky11: $p=1,000$, $n=6$); D9S304: $p=0,167$; $n=6$; Mikrosatellitenalteration mindestens in einem der Marker: $p=0,500$; $n=6$, LOH in mindestens einem der Marker $p=1,000$; $n=4$).

Methylierungsstufen	Pky 11				
	ROH	MSI	LOH	MSS, NI	Gesamt
Nicht methyliert	4 (23,5)	1 (7,1 %)	7 (41,2 %)	5 (29,4 %)	17 (100,0 %)
Leicht methyliert	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
Zur Hälfte methyliert	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)	2 (100,0 %)
Vollständig methyliert	0 (0,0 %)	1 (50,0 %)	0 (0,0 %)	1 (50,0 %)	2 (100,0 %)
GESAMT	5 (22,7 %)	2 (90,9 %)	7 (31,8 %)	8 (36,4 %)	22 (100,0 %)

Tabelle 49: Papillenkzinome: Methylierungsstatus in Abhängigkeit von Alteration in pky11; p=0,188

Methylierungsstufen	D9S304				
	ROH	MSI	LOH	MSS, NI	Gesamt
Nicht methyliert	10 (55,6 %)	4 (22,2 %)	3 (16,7 %)	1 (5,5 %)	18 (100,0 %)
Leicht methyliert	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)	1 (100,0 %)
Zur Hälfte methyliert	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
Vollständig methyliert	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
GESAMT	14 (60,9 %)	4 (17,4 %)	3 (13,0 %)	2 (8,6 %)	23 (100,0 %)

Tabelle 50: Papillenkzinome: Methylierungsstatus in Abhängigkeit von Alteration in D9S304; p=0,429

Methylierungsstufen	Mikrosatellitenalteration in mindestens 1 Marker			
	ROH	MSI	LOH	Gesamt
Nicht methyliert	6 (35,3 %)	3 (17,6 %)	6 (35,3 %)	17 (100,0 %)
Leicht methyliert	1 (100,0 %)	0 (100,0 %)	0 (100,0 %)	1 (100,0 %)
Zur Hälfte methyliert	2 (100,0 %)	0 (100,0 %)	0 (100,0 %)	2 (100,0 %)
Vollständig methyliert	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	0 (100,0 %)	2 (100,0 %)
GESAMT	10 (45,5 %)	4 (18,2 %)	8 (36,4 %)	22 (100,0 %)

Tabelle 51: Papillenkarcinome: Methylierungsstatus in Abhängigkeit von Alteration in mindestens einem der Marker pky11 und D9S304; p=0,720

Methylierungsstufen	LOH in mindestens 1 Marker		
	ROH	LOH	Gesamt
Nicht methyliert	6 (42,9 %)	8 (57,1 %)	14 (100,0 %)
Leicht methyliert	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
Zur Hälfte methyliert	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
Vollständig methyliert	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
GESAMT	11 (57,9 %)	8 (42,1 %)	19 (100,0 %)

Tabelle 52: Papillenkarcinome: Methylierungsstatus in Abhängigkeit von LOH in mindestens einem der Marker pky11 und D9S304; p=0,243

3.5 IMMUNHISTOLOGIE

3.5.1 p16^{INK4a}-Expression in Normalgewebe, Adenomen und Karzinomen

p16^{INK4a}-Verlust eines Tumors wurde bei 0 %, p16^{INK4a}-Überexpression bei einem Anteil von mehr als 70 % Zellen mit zytoplasmatischer und/oder nukleärer p16^{INK4a}-Expression definiert. Tabelle 53 zeigt die Häufigkeit von prozentualem Expressionsverlust, normaler Expression und Überexpression in 411 Gewebeproben von Normalgewebe, reinen und karzinomassoziierten Adenomen (Ad) sowie De-novo- und Ex-Adenom-Karzinomen von Dünndarm und Papille. Die Beziehungen der Gewebe untereinander zeigt Tabelle 54.

Der Vergleich von p16^{INK4a}-Expressionsverlust bei den einzelnen Entitäten zeigte wie in der FISH keinen signifikanten Unterschied zwischen Normalgewebe (6,8 %) und reinen Adenomen (20,0 %; $p=0,08$, $n=171$), jedoch einen signifikanten Unterschied zu karzinomassoziierten Adenomen (44,2 %; $p=0,034$; $n=75$). Karzinomassoziierte Adenome und Ex-Adenom-Karzinome (40,6 %) waren nicht verschieden ($p=0,728$; $n=134$). Im Gegensatz zur FISH bestand kein signifikanter Unterschied von Ex-Adenom-Karzinomen und De-novo-Karzinomen (48,1 %; $p=0,427$; $n=171$). Die beiden Karzinomentitäten unterschieden sich jeweils hochsignifikant von Normalgewebe ($p<0,001$).

Die p16^{INK4a}-Überexpression nahm gegenüber Normalgewebe (0,6 %) bei reinen Adenomen (8,0 %) nicht signifikant zu ($p=0,056$; $n=171$). Assoziierte Adenome (2,8 %) zeigten tendenziell seltener p16^{INK4a}-Überexpression ($p=0,282$; $n=95$) als reine Adenome (8,0%). Bei Ex-Adenom-Karzinomen (10,9 %) war Überexpression tendenziell häufiger als bei assoziierten Adenomen ($p=0,162$; $n=134$) und etwa gleich häufig wie bei De-novo-Karzinomen (10,3; $p=1,000$; $n=170$).

Entität	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
Normalgewebe	12 (6,8 %)	133 (91,1 %)	1 (0,6 %)	146
r-Ad	5 (20,0 %)	18 (72,0 %)	2 (8,0 %)	25
ca-ass-Ad	31 (44,2 %)	33 (52,9 %)	2 (2,8 %)	70
Ca-ex-Ad	26 (40,6 %)	33 (59,4 %)	7 (10,9 %)	64
De-novo-Ca	51 (48,1 %)	62 (58,5 %)	11 (10,3 %)	106
Karzinome (gesamt)	77 (45,3 %)	95 (55,8 %)	18 (10,6 %)	170
Adenome (gesamt)	36 (37,9 %)	40 (42,1 %)	4 (4,2 %)	95

Tabelle 53: Immunhistochemische p16^{INK4a}-Protein-Expression in Normal-, Adenom- und Karzinomgewebe von Papille und Dünndarm

Entität	p16 ^{INK4a} -Expression: Prozentsatz				Entität
	Verlust vs. normal und Überexpression	Verlust vs. normal	Überexpression vs. normal und Verlust	Überexpression vs. normal	
No	p=0,080	p=0,061	p=0,056	p=0,044	r-Ad
No	p<0,001	p<0,001	p=0,245	p=0,109	ca-ass-Ad
No	p<0,001	p<0,001	p=0,001	p<0,001	Ca-ex-Ad
No	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	De-novo-Ca
r-Ad	p=0,034	p=0,029	p=0,282	p=0,616	ca-ass-Ad
ca-ass-Ad	p=0,728	p=0,718	p=0,282	p=0,162	Ca-ex-Ad
Ca-ex-Ad	p=0,427	p=1,000	p=1,000	p=0,791	De-novo-Ca

Tabelle 54: p16^{INK4a}- Expression im Normal-, Adenom- und Karzinomgewebe im Vergleich zueinander.

3.5.2 16^{INK4a}-Expression bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen

Bei **Papillenkarcinomen** war p16^{INK4a}-*Expressionsverlust* mit 47,7 % häufiger als bei den **Dünndarmkarzinomen** (24,0 %), während p16^{INK4a}-Überexpression häufiger bei den Dünndarm- (20,0 %) als bei den Papillenkarcinomen (9,4 %) anzutreffen war. Der Unterschied war signifikant (p=0,052; n=153, Tabelle 55). p16^{INK4a}-Expressionsverlust war signifikant häufiger bei Papillenkarcinomen (p=0,045; n=153) als bei Dünndarmkarzinomen. Bei Überexpression konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die p16^{INK4a}-Expression von **De-novo- und Ex-Adenom Papillenkarcinomen** (p=0,729; n=128; Tabelle 57) sowie von **De-novo- und Ex-Adenom Dünndarmkarzinomen** (p=0,865; n=25; Tabelle 57) unterschied sich nicht signifikant.

De-novo-Papillenkarcinome zeigten häufiger p16^{INK4a}-Verlust (51,6 %; p=0,145; n=74) als **De-novo-Dünndarmkarzinome** (28,5 %). p16^{INK4a}-Überexpression hingegen war mit 21,4 % deutlich häufiger bei De-novo-Dünndarmkarzinomen (21,4 %; p=0,145; n=74) als bei De-novo-Papillenkarcinomen (8,3 %). Die Unterschiede der p16^{INK4a}-Expressionsmuster waren jedoch nicht signifikant (p=0,159; n=74).

Bei **Ex-Adenom-Karcinomen** war p16^{INK4a}-Expressionsverlust mit 44,1 % häufiger bei Papillenkarcinomen (p=0,184; n=79) als bei Dünndarmkarzinomen (18,1 %). p16^{INK4a}-Überexpression hingegen war häufiger bei Dünndarmkarzinomen (18,2 vs 10,2 %; p=0,605; n=79). Auch bei gleichzeitiger Betrachtung aller Expressionsstufen bestand kein signifikanter Zusammenhang (p= 0,211, n=79).

	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
Papillenkarcinome	61 (47,7 %)	55 (43,0 %)	12 (9,4 / 17,9 %)	128 (100,0 %)
Dünndarmkarcinome	6 (24,0 %)	14 (56,0 %)	5 (20,0 / 26,3 %)	25 (100,0 %)
Alle Karcinome	67 (43,8 %)	69 (45,1 %)	17 (11,1 / 19,8 %)	153 (100,0 %)

Tabelle 55: p16^{INK4a}-Expression bei Papillen- und Dünndarmkarcinomen; p= 0,052

Papillenkarcinome	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
De-novo-Ca	31 (51,6 %)	24 (40,0 %)	5 (8,3 / 17,2%)	60 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	30 (44,1 %)	31 (45,6 %)	7 (10,3 / 18,4 %)	68 (100,0 %)
Alle Karcinome	61 (47,7 %)	55 (43,0 %)	12 (9,3 / 17,9 %)	128 (100,0 %)

Tabelle 56: p16^{INK4a}-Expression bei De-novo- und Ex-Adenom-Papillenkarcinomen; p=0,729

Dünndarmkarcinome	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
De-novo-Ca	4 (28,6 %)	7 (50,0 %)	3 (21,4 / 30,0%)	14 (100,0 %)
Ca-ex-Ad	2 (18,2 %)	7 (63,6 %)	2 (18,1 / 22,2 %)	11 (100,0 %)
Alle Karcinome	6 (24,0 %)	14 (56,0 %)	5 (20,0 / 26,3 %)	25 (100,0 %)

Tabelle 57: p16^{INK4a}-Expression bei De-novo und Ex-Adenom-Dünndarmkarcinomen; p= 0,865

3.5.3 16^{INK4a}-Expression und histologische Subtypen

Zwischen **histologischen Subtypen von Papillenkarcinomen** und p16^{INK4a}-Expression bestand kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,461$; $n=128$; Tabelle 58). Die Häufigkeit von p16^{INK4a}-Expressionsverlust unterschied sich z.T. jedoch stark. Der Vergleich von Kombinationen histologischer Subtypen ergab die in Tabelle 59 gezeigten Ergebnisse. Intestinale/intestinal-muzinöse Papillenkarcinome unterschieden sich nicht signifikant von pankreatobiliären Karcinomen ($p=0,079$). Ein signifikanter Unterschied bestand in der Gruppe der Ex-Adenom-Papillenkarcinome zwischen **intestinalen/intestinal-muzinösen** und **G3-Adenokarcinomen** ($p=0,040$). Bei Berechnung von p16^{INK4a}-Verlust gegenüber p16^{INK4a}-Expression ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen **intestinalen/intestinal-muzinösen** gegenüber **pankreatobiliären Papillenkarcinomen** ($p=0,031$; $n=101$) bzw. gegenüber **pankreatobiliären/G3-Adenokarcinomen/invasiv-papillären Karcinomen** ($p=0,020$; $n=128$). Zwischen **intestinalen/intestinal-muzinösen** und **G3-Adenokarcinomen** bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,202$; $n=89$). Bei Gegenüberstellung von Überexpression und normale Expression/Expressionsverlust waren keine signifikanten Zusammenhänge feststellbar. Zwischen histologischen Subtypen von **Dünndarmkarcinomen** und der p16^{INK4a}-Expression bestand ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,964$; $n=25$).

Histologischer Subtyp	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
intestinal	23 (39,6 %)	28 (48,3 %)	7 (12,1 / 20,0 %)	58 (100,0 %)
intestinal-muzinös	3 (27,3 %)	7 (63,6 %)	1 (9,1 / 12,5 %)	11 (100,0 %)
pankreatobiliär	20 (6,3 %)	10 (31,2 %)	2 (6,3 / 16,6)	32 (100,0 %)
G3-Adenokarcinom	11 (55 %)	7 (35,0 %)	2 (10,0 / 22,2 %)	20 (100,0 %)
invasiv-papillär	4 (57,1 %)	3 (42,9 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	7 (100,0 %)
Gesamt	61 (47,7 %)	55 (43,0 %)	12 (9,3 / 17,9 %)	128 (100,0 %)

Tabelle 58: p16^{INK4a}-Signalverlust und histologische Subtypen von Papillenkarcinomen; $p=0,46$

p16^{INK4a}-Expression	Histologischer Subtyp von Papillenkarcinomen	
	Subtypen-Kombination	Signifikanzniveau
Verlust vs. normale Expression vs. Über-expression	intestinal + int.-mucinös vs. Pankreatobiliär	Papillenkarcinome: p=0,079; n=101 De-novo-Ca: p=0,301; n=46 Ca-ex-Ad: p=0,515; n=55
	intestinal + int.-mucinös vs. G3-Adeno-Ca	Papillenkarcinome: p=0,390; n=89 De-novo-Ca: p=1,000; n=34 Ca-ex-Ad: p=0,040; n=55
	intestinal + int.-mucinös vs. pankreatob. + G3-Adeno-Ca + inv.-pap.	Papillenkarcinome: p=0,047; n=128 De-novo-Ca: p=0,668; n=60 Ca-ex-Ad: p=0,089; n=68
Verlust vs. Expression	intestinal + int.-mucinös vs. pankreatobiliär	Papillenkarcinome: p=0,031; n=101
	intestinal + int.-mucinös vs. G3-Adeno-Ca	Papillenkarcinome: p=0,202; n=89
	intestinal + int.-mucinös vs. pankreatob. + G3-Adeno-Ca + inv.-pap.	Papillenkarcinome: p=0,021; n=128
Über-expression vs. normale Expression	intestinal + int.-mucinös vs. pankreatobiliär	Papillenkarcinome: p=1,000; n=55
	intestinal + int.-mucinös vs. G3-Adeno-Ca	Papillenkarcinome: p=1,000; n= 52
	intestinal + int.-mucinös vs. pankreatob. + G3-Adeno-Ca + inv.-pap.	Papillenkarcinome: p=1,000; n=67

Tabelle 59: Papillenkarcinome: p-Werte der Beziehung unterschiedlicher Korrelationen von histologischen Subtypen anhand der p16^{INK4a}-Expression; n=128

Histologischer Subtyp	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
intestinal	5 (27,8 %)	10 (55,6 %)	3 (16,7 / 23,1 %)	18 (100,0 %)
intestinal-muzinös	1 (25,0 %)	2 (50,0 %)	1 (25,0 / 33,3 %)	4 (100,0 %)
G3-Adenokarzinom	0 (0,0 %)	2 (66,7 %)	1 (33,3 / 33,3 %)	3 (100,0 %)
Gesamt	6 (24,0 %)	14 (56,0 %)	5 (20,0 / 26,3 %)	25 (100,0 %)

Tabelle 60: p16^{INK4a}-Signalverlust und histologische Subtypen von Dünndarmkarzinomen; p=0,946

3.5.4 p16^{INK4a}-Expression und Überleben

Bei **De-novo-Papillenkarcinomen** war der Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und Überleben hochsignifikant ($p < 0,001$; Abbildung 22). Das längste Überleben zeigten Patienten mit Expressionsverlust, das kürzeste Patienten mit p16^{INK4a}-Überexpression. Normale Expression lag dazwischen. Bei **Ex-Adenom-Papillenkarcinomen** ($p = 0,722$; $n = 28$; Abbildung 23) und **Papillenkarcinomen insgesamt** ($p = 0,550$; $n = 96$; Abbildung 24) fand sich das längste Überleben in der Gruppe mit normaler Expression, gefolgt von p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Das schlechteste Überleben zeigten erneut Patienten mit p16^{INK4a}-Überexpression.

Bei **Dünndarmkarzinomen** war bei Überexpression verglichen mit normaler Expression das Überleben ebenfalls kürzer. Die Berechnung von Mittelwerten war jedoch nicht möglich, da alle Fälle mit Expressionsverlust zensiert waren ($p = 0,278$; $n = 8$; Abbildung 25).

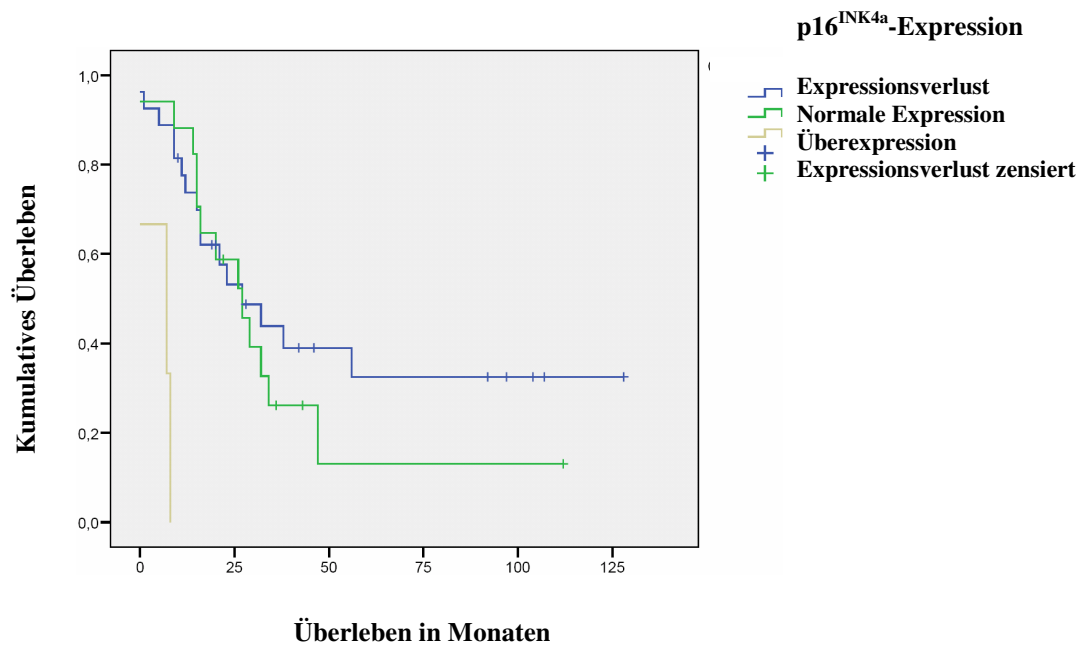


Abbildung 22: Gesamtüberleben bei Patienten mit De-novo-Papillenkarcinomen in Abhängigkeit der p16^{INK4a}-Expression; $p < 0,001$; $n = 47$ (Expressionsverlust: 55,4 Monate mittleres Überleben, CI95 = 34,0 – 76,8; normale Expression: 35,7 Monate mittleres Überleben, CI95 = 17,9 – 53,5; Überexpression: 5,0 Monate mittleres Überleben, CI95 = 0,1 – 9,9 Monate)

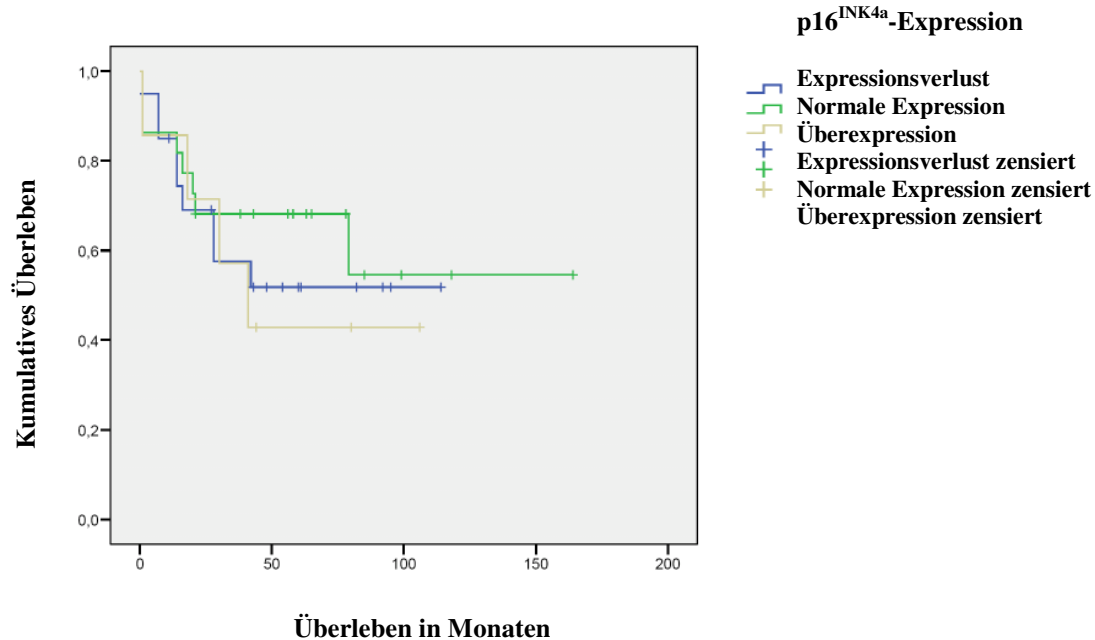


Abbildung 23: Gesamtüberleben bei Patienten mit Ex-Adenom-Papillenkarcinomen in Abhängigkeit der p16^{INK4a}-Expression; $p = 0,722$; $n = 28$ (Expressionsverlust: mittleres Überleben 67,7 Monate, CI95 = 45,6 – 89,9 Monate; normale Expression: 103,6 Monate, CI95 = 70,1 – 137,1 Monate; Überexpression: 58,3 Monate mittleres Überleben, CI95 = 26,56 – 90,0 Monate)

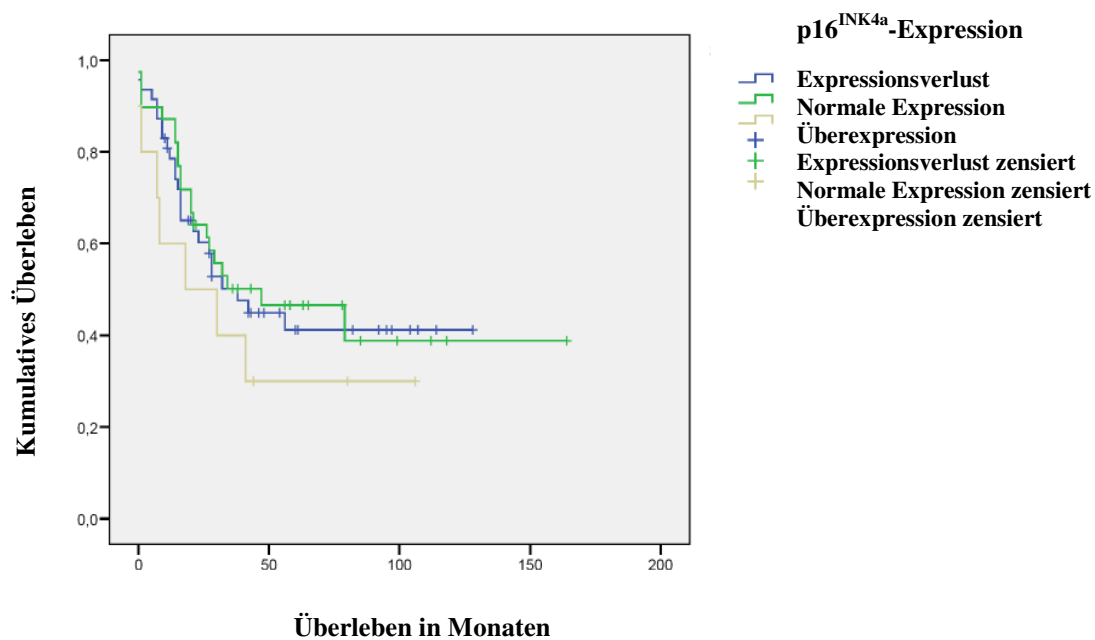


Abbildung 24: Gesamtüberleben bei Patienten mit Papillenkarcinomen in Abhängigkeit der p16^{INK4a}-Expression; $p=0,550$; $n=96$ (Expressionsverlust: 47,6 Monate mittleres Überleben, CI95 = 47,6 – 80,8 Monate; normale Expression: 79,8 Monate mittleres Überleben, CI95 = 55,4 – 104,2 Monate; Überexpression: 42,3 Monate mittleres Überleben, CI95 = 15,4 – 69,2 Monate)

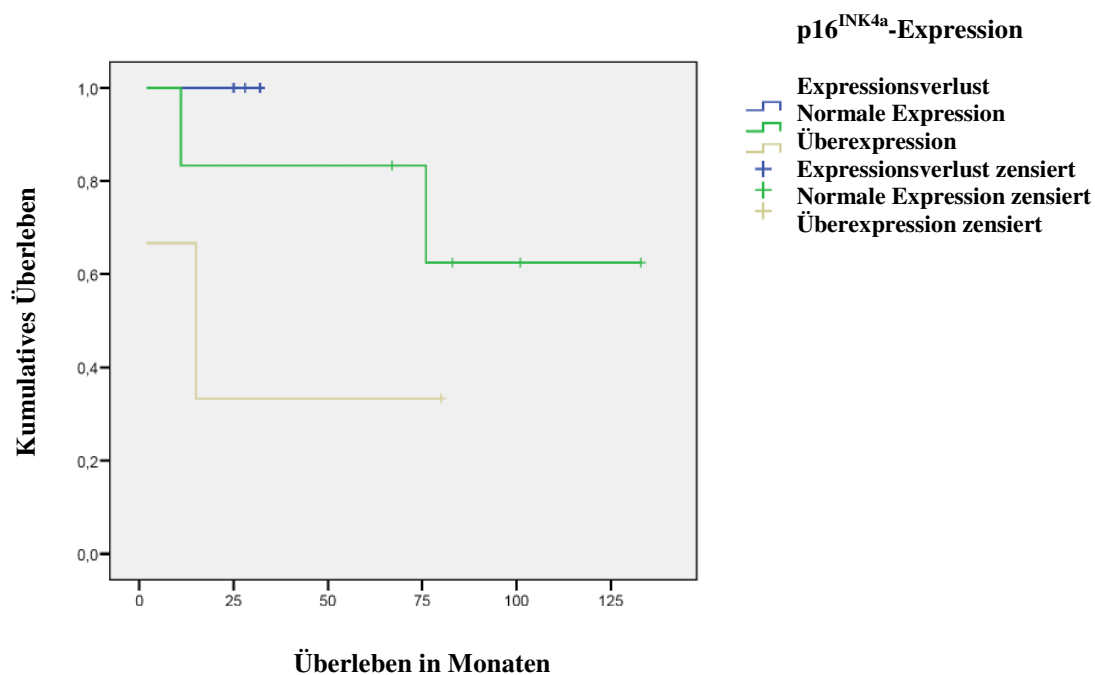


Abbildung 25: Gesamtüberleben bei Patienten mit Dünndarmkarcinom in Abhängigkeit der p16^{INK4a}-Expression; $p=0,278$; $n=8$ (mittleres Überleben nicht zu berechnen wegen Zensierung aller Fälle mit Expressionsverlust)

3.5.5 p16^{INK4a}-Expression und klinisch-pathologische Variablen

Bei **Papillenkarzinomen** bestand ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,054$; $n=118$; Tabelle 61) zwischen p16^{INK4a}-Überexpression und **UICC-Stadium** (*gruppiert I-IIA vs IIB vs III und IV*). Während der p16^{INK4a}-Expressionsverlust über alle Stadien in etwa gleich war, nahm die p16^{INK4a}-Überexpression von 1,7 % im Stadium I bis IIA auf 18 % im Stadium II bzw. 9 % im Stadium III zu. Es bestand kein Unterschied von Expressionsverlust gegenüber vorhandener Expression ($p=0,737$; $n=118$), während p16^{INK4a}-Überexpression gegenüber normaler Expression von 2,5 % in Stadium I-IIA auf 32,1 % in Stadium IIB und 25,0 % in Stadium III und IV signifikant zunahm ($p=0,016$; $n=61$).

Die Untersuchung von **Grading** und p16^{INK4a}-Expression ($p=0,421$; $n=126$; Tabelle 62) zeigte eine leichte Zunahme des p16^{INK4a}-Verlusts von G1 bis G3. Die Überexpression stieg von 0 % in G1 auf 10,3 % in G2 und 10,5 % in G3. Weder für Expressionsverlust gegenüber Expression ($p=0,357$; $n=126$) noch für normale Expression vs. Überexpression ($p=0,534$; $n=66$) bestand ein signifikanter Unterschied.

Bei den **pT-Stadien** war in T1 und T2 verglichen mit T3 und T4 eine leichte Abnahme von p16^{INK4a}-Signalverlust und eine deutliche Zunahme der p16^{INK4a}-Überexpression zu beobachten. Der Zusammenhang war statistisch nicht signifikant ($p=0,066$; $n=126$; Tabelle 63). Bei Gegenüberstellung von T1/2 vs. T3/4 nahm Überexpression gegenüber normaler Expression signifikant zu ($p=0,003$; $n=126$), während Expressionsverlust gegenüber Expression signifikant abnahm ($p=0,033$; $n=126$).

Zwischen p16^{INK4a}-Expression und **Nodalstatus** bestand kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,086$; $n=117$; Tabelle 64): während p16^{INK4a}-Verlust bei pN0 (50,8 %) etwas häufiger war als bei pN1, nahm p16^{INK4a}-Überexpression von 3,3 % auf 15,5 % zu. Die Auswertung von Verlust gegenüber normaler Expression (44,8 %; $p=0,584$; $n=117$) ergab keine Unterschiede, während innerhalb der p16^{INK4a}-exprimierenden Karzinome p16^{INK4a}-Überexpression signifikant zunahm ($p=0,029$; $n=117$).

UICC-Stadium (gruppiert)	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
IA, IB, IIA	29 (50,9 %)	27 (47,4 %)	1 (1,8 /2,5 %)	57 (100,0 %)
IIB	22 (44,0 %)	19 (38,0 %)	9 (18,0 /32,1 %)	50 (100,0 %)
III, IV	6 (54,5 %)	4 (36,4 %)	1 (9,1 /25,0 %)	11 (100,0 %)
Gesamt	57 (48,3 %)	50 (42,4 %)	11 (9,3 /18,0 %)	118 (100,0 %)

Tabelle 61: Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und UICC-Stadium (gruppiert); p=0,054

Grading	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
G1	4 (36,4 %)	7 (63,7 %)	0 (0,0 /0,0 %)	11 (100,0 %)
G2	25 (43,1 %)	27 (46,6 %)	6 (10,3 /18,2 %)	58 (100,0 %)
G3	31 (54,4 %)	20 (35,1 %)	6 (10,5 /23,1 %)	57 (100,0 %)
Gesamt	60 (47,6 %)	54 (42,9 %)	12 (9,5 /18,7 %)	126 (100,0 %)

Tabelle 62: p16^{INK4a}-Expression und Grading bei Papillenkarcinomen p=0,421

pT-Stadium	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pT1	11 (57,9 5%)	8 (42,1 %)	0 (0,0 /0,0 %)	19 (100,0 %)
pT2	27 (56,3 %)	20 (41,7 %)	1 (2,1 /4,8 %)	48 (100,0 %)
pT3	18 (0,36 %)	23 (46,0 %)	9 (18,0 /28,1 %)	50 (100,0 %)
pT4	4 (44,4 %)	4 (44,4 %)	1 (11,1 /20,0 %)	9 (100,0 %)
Gesamt	60 (47,6 %)	55 (43,7 %)	11 (8,7 /16,6 %)	126 (100,0 %)

Tabelle 63: Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und pT-Stadium; p=0,066

pN-Status	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pN0	30 (50,8 %)	27 (45,8 %)	2 (3,4 / 6,9 %)	59 (100,0 %)
pN1	26 (44,8 %)	23 (39,7 %)	9 (15,5 / 28,1 %)	58 (100,0 %)
Gesamt	56 (47,9 %)	50 (42,7 %)	11 (9,4 / 18,0 %)	117 (100,0 %)

Tabelle 64: Papillenkzinome: p16^{INK4a}-Expression und Nodalstatus; p=0,086

Bei **De-novo-Papillenkzinomen** bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Signalverlust und **Grading** (p=0,521; n=58; Tabelle 65). Auch hier fand sich jedoch bei annähernd gleichen Werten für p16^{INK4a}-Signalverlust eine Zunahme von p16^{INK4a}-Überexpression von G1 (0 %) nach G2 (3,7 %) und G3 (13 %). p16^{INK4a}-Verlust gegenüber Expression (p=0,893; n=58) und normale Expression gegenüber Überexpression (p=0,34; n=58) veränderten sich nicht signifikant. Mit zunehmendem **pT-Stadium** nahm tendenziell (p=0,387; n=58; Tabelle 66) der p-16-Signalverlust ab sowie die p16^{INK4a}-Überexpression zu. pT1 und pT2 vs. pT3 und pT4 unterschieden sich bei getrennter Berechnung von p16^{INK4a}-Überexpression gegenüber normaler Expression signifikant (p=0,048, n=58). Bei p16^{INK4a}-Verlust gegenüber -Expression bestand keine Assoziation (p=0,292; n=58).

Beim **Nodalstatus** pN1 fand sich eine leichte Abnahme von p16^{INK4a}-Verlust, die Überexpression blieb verglichen mit pN0 in etwa gleich. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang (p=0,526; n=56, Tabelle 67). Auch bei Betrachtung von p16^{INK4a}-Verlust gegenüber Expression (p=0,422; n=56) und Überexpression gegenüber normaler Expression (p=0,591; n=26) bestanden keine signifikanten Zusammenhänge. Die Untersuchung von p16^{INK4a}-Expression und **UICC-Stadium (gruppiert)** zeigte eine Abnahme von p16^{INK4a}-Expressionsverlust von I –IIA (63,6 %) gegenüber IIB (48, 3 %) und III-IV (55,1 %). Die Überexpression nahm zu (IA-IIA: 4,5 %, IIB: 6,8 %, III und IV: 20,0 %). Die Unterschiede waren nicht signifikant (p=0,521; n=56; Tabelle 68). Auch bei Betrachtung von Expressionsverlust gegenüber Expression (p=0,486; n=56) und Expression gegenüber Überexpression (p= 0,560; n=26) bestanden keine signifikanten Zusammenhänge.

Grading	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
G1	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	2 (100,0 %)
G2	13 (48,1 %)	13 (48,1 %)	1 (3,7 / 7,1 %)	27 (100,0 %)
G3	16 (55,1 %)	9 (31,0 %)	4 (13,8 / 30,8 %)	29 (100,0 %)
Gesamt	30 (51,7 %)	23 (39,7 %)	5 (8,6 / 17,8 %)	58 (100,0 %)

Tabelle 65: De-novo-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und Grading; p=0,521

pT-Stadium	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pT1	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	4 (100,0 %)
pT2	15 (46,2 %)	11 (42,3 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	26 (100,0 %)
pT3	10 (43,5 %)	10 (43,5 %)	3 (13,0 / 23,1 %)	23 (100,0 %)
pT4	2 (40,0 %)	2 (40,0 %)	1 (20,0 / 33,3 %)	5 (100,0 %)
Gesamt	30 (51,7 %)	24 (41,4 %)	4 (6,9 / 14,2 %)	58 (100,0 %)

Tabelle 66: De-novo-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und pT-Stadium; p=0,387

pN-Status	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pN0	14 (60,9 %)	7 (30,4 %)	2 (8,7 / 22,1 %)	23 (100,0 %)
pN1	16 (48,5 %)	15 (45,5 %)	2 (6,1 / 11,7 %)	33 (100,0 %)
Gesamt	30 (53,6 %)	22 (39,3 %)	4 (7,1 / 15,3 %)	56 (100,0 %)

Tabelle 67: De-novo-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und pN-Status; p=0,526

UICC-Stadium (gruppiert)	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
IA, IB, IIA	14 (63,6 %)	7 (31,8 %)	1 (45,5 / 12,5 %)	22 (100,0 %)
IIB	14 (48,3 %)	13 (44,8 %)	2 (6,9 / 13,3 %)	29 (100,0 %)
II, IV	2 (40,0 %)	2 (40,0 %)	1 (20,0 / 33,3 %)	5 (100,0 %)
Gesamt	30 (53,6 %)	22 (39,3 %)	4 (7,1 / 15,3 %)	56 (100,0 %)

Tabelle 68: De-novo-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und UICC-Stadium (gruppiert); p=0,521

Bei **Ex-Adenom-Papillenkarcinomen** bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und **Grading** (p=0,626; n=68; Tabelle 69). p16^{INK4a}-Verlust und p16^{INK4a}-Überexpression nahmen im Vergleich von G1 mit G2 und G3 zu. Für Expressionsverlust gegenüber Expression (p= 0,467; n=68) und Überexpression gegenüber normaler Expression (p= 0,547; n=38) bestand kein signifikanter Zusammenhang. Bei höheren **pT-Stadien** stieg die p16^{INK4a}-Expression relativ stark an. Es bestand jedoch kein signifikanter Zusammenhang (p=0,261; n=68; Tabelle 70). Bei getrennter Betrachtung von p16^{INK4a}-Verlust und Überexpression nahm die p16^{INK4a}-Überexpression von pT1/2 nach pT3/4 signifikant (p=0,041; n=68), der p16^{INK4a}-Expressionsverlust tendenziell zu (p=0,089; n=68). Zwischen dem **Nodalstatus** und der p16^{INK4a}-Expression bestand ein signifikanter Zusammenhang (p=0,002; n=61; Tabelle 71): Bei ähnlicher Häufigkeit von p16^{INK4a}-Verlust (p=0,796; n=61) zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme (p=0,001; n=61) der p16^{INK4a}-überexprimierenden Karcinome gegenüber solcher mit normaler Expression von pN0 nach pN1.

Auch zwischen p16^{INK4a}-Expression und **UICC-Stadium (gruppiert)** bestand ein signifikanter Zusammenhang (p=0,002; n=62; Tabelle 72). Der p16^{INK4a}-Expressionsverlust nahm bei Stadium III und IV gegenüber Ia-IIa und IIB leicht zu. Die p16^{INK4a}-Überexpression stieg von Stadium I, IIA nach IIB stark an, im Stadium III und IV war keine Überexpression mehr vorhanden. Die-Veränderung von p16^{INK4a}-Expressionsverlust gegenüber Expression war nicht singifikant (p=0,484; n=62), während zwischen Überexpression und normaler Expression ein hoch signifikanter Zusammenhang bestand (p< 0,001; n= 35).

Grading	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
G1	3 (33,3 %)	6 (66,6 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	9 (100,0 %)
G2	12 (38,7 %)	14 (45,2 %)	5 (16,1 / 26,3 %)	31 (100,0 %)
G3	15 (53,6 %)	11 (39,2 %)	2 (7,1 / 15,3 %)	28 (100,0 %)
Gesamt	30 (44,1 %)	31 (45,5 %)	7 (10,3 / 18,4 %)	68 (100,0 %)

Tabelle 69: Ex-Adenom-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und Grading; p=0,626

pT-Stadien	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pT1	8 (53,3 %)	7 (46,7 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	15 (100,0 %)
pT2	12 (54,6 %)	9 (40,9 %)	1 (4,5 / 10,0 %)	22 (100,0 %)
pT3	8 (29,6 %)	13 (48,2 %)	6 (22,2 / 31,5 %)	27 (100,0 %)
pT4	2 (50,0 %)	2 (50,0 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	4 (100,0 %)
Gesamt	30 (44,1 %)	31 (45,6 %)	7 (10,3 / 18,4 %)	68 (100,0 %)

Tabelle 70: Ex-Adenom-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und pT-Stadien; p=0,261

pN-Status	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pN0	16 (44,4%)	20 (55,6 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	36 (100,0 %)
pN1	10 (40,0 %)	8 (32,0 %)	7 (28,0 / 46,6 %)	25 (100,0 %)
Gesamt	26 (42,6 %)	28 (46,0 %)	7 (11,5 / 20,0 %)	61 (100,0 %)

Tabelle 71: Ex-Adenom-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und pN-Stadium; p=0,002

UICC-Stadium (gruppiert)	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
IA, IB, IIA	15 (42,9 %)	20 (57,1 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	35 (100,0 %)
IIB	8 (38,1 %)	6 (28,6 %)	7 (33,3 / 53,8 %)	21 (100,0 %)
III, IV	4 (66,7 %)	2 (33,3 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	6 (100,0 %)
Gesamt	27 (43,5 %)	28 (45,2 %)	7 (11,3 / 20,0 %)	62 (100,0 %)

Tabelle 72: Ex-Adenom-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression und UICC-Stadium (gruppiert); p=0,002

Bei **Dünndarmkarzinomen** bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und **Grading** (p=0,595; n=23; Tabelle 73). Während von G2 nach G3 p16^{INK4a}-Expressionsverlust abnahm, stieg die Überexpression von 13,3 % auf 25,0 %. Die Berechnung von p16^{INK4a}-Expressionsverlust vs. Expression (p= 0,369; n= 23) und normale Expression vs. Überexpression (p= 1,000; n= 17) ergab ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge. Bei höheren **pT-Stadien** nahm die p16^{INK4a}-Expression zu (pT2: 0 %; pT3: 18 %; pT4: 25 %). Der Zusammenhang war statistisch nicht signifikant (p=0,157; n=23; Tabelle 74). Zwischen pT2 und pT3/4 bestand weder für Überexpression (p=1,000; n=23) noch für Expressionsverlust (p=1,000; n=23) ein signifikanter Unterschied. Beim **Nodalstatus** nahmen sowohl p16^{INK4a}-Verlust von pN0 (13,1 %) nach pN1 (25,0 %) als auch p16^{INK4a}-Überexpression (pN0: 9,1 %; pN2: 37,5 %) zu. Der Zusammenhang war nicht signifikant (p=0,312; n=19; Tabelle 75). Auch bei getrennter Betrachtung von Überexpression (p=0,262; n=19) und Verlust (p=1,000; n=19) bestanden keine signifikanten Unterschiede. Da sich alle Dünndarmkarzinome im Stadium III und IV befanden, konnte keine Berechnung von p16^{INK4a}-Expression und **UICC-Stadium (gruppiert)** erfolgen.

Grading	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
G1	-	-	-	-
G2	5 (33,3 %)	8 (53,3 %)	2 (13,3 / 20,0 %)	15 (100,0 %)
G3	1 (12,5 %)	5 (62,5 %)	2 (25,0 / 28,6 %)	8 (100,0 %)
Gesamt	6 (26,1 %)	13 (56,5 %)	4 (17,4 / 23,5 %)	23 (100,0 %)

Tabelle 73: Dünndarmkarzinome: p16^{INK4a}-Expression und Grading; p=0,595

pT-Stadium	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pT1	-	-	-	-
pT2	1 (25,0 %)	3 (75,0 %)	0 (0,0 / 0,0 %)	4 (100,0 %)
pT3	5 (45,5 %)	4 (36,4 %)	2 (18,2 / 33,3 %)	11 (100,0 %)
pT4	0 (0,0 %)	6 (75,0 %)	2 (25,0 / 25,0 %)	8 (100,0 %)
Gesamt	6 (26,1 %)	13 (56,2 %)	4 (17,4 / 23,5 %)	23 (100,0 %)

Tabelle 74: Dünndarmkarzinome: p16^{INK4a}-Expression und pT-Stadium; p=0,157

pN-Status	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
pN0	2 (18,2 %)	8 (72,7 %)	1 (9,1 / 11,1 %)	11 (100,0 %)
pN1	2 (25,0 %)	3 (37,5 %)	3 (37,5 / 50,0 %)	8 (100,0 %)
Gesamt	4 (21,1 %)	11 (57,9 %)	4 (21,1 / 26,6 %)	19 (100,0 %)

Tabelle 75: Dünndarmkarzinome: p16^{INK4a}-Expression und pN-Status; p=0,312

UICC-Stadium (gruppiert)	p16 ^{INK4a} -Expression			
	Verlust	Normal	Überexpression	Gesamt
IA, IB, IIA	-	-	-	-
IIB	-	-	-	-
III, IV	2 (22,2 %)	3 (33,3 %)	4 (44,4 / 57,1 %)	9 (100,0 %)
Gesamt	2 (22,2 %)	3 (33,3 %)	4 (44,4 / 57,1 %)	9 (100,0 %)

Tabelle 76: Dünndarmkarzinome: p16^{INK4a}-Expression und UICC-Stadium (gruppiert)

3.5.6 p16^{INK4a}-Expression und (epi-)genetische Alterationen

3.5.6.1 p16^{INK4a}-Expression und p16^{INK4a}-Signalverlust

Gleichzeitiger p16^{INK4a}-Expressions- und Signalverlust bestand in 51,0 % der **Papillenkarcinome** (p=0,268; n=86; Tabelle 77), 63,0 % der **De-novo-Papillenkarcinome** (p=0,225; n=40; Tabelle 78) und 38,0 % der **Ex-Adenom-Papillenkarcinome** (p=1,000; n= 46; Tabelle 79). **Dünndarmkarcinome** zeigten in 40,0 % der Fälle mit p16^{INK4a}-Signal- auch Expressionsverlust. Der Zusammenhang war ebenfalls nicht signifikant (p=0,600; n=17; Tabelle 80).

p16 ^{INK4a} -Signalverlust	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
Ja	18 (51,4 %)	17 (48,6 %)	35 (100,0 %)
Nein	19 (37,3 %)	32 (62,7 %)	51 (100,0 %)
Gesamt	37 (43,0 %)	49 (57,0 %)	86 (100,0 %)

Tabelle 77: Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit von p16^{INK4a}-Signalverlust; p=0,268

p16 ^{INK4a} -Signalverlust	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
Ja	9 (42,9 %)	12 (57,1 %)	21 (100,0 %)
Nein	12 (63,2 %)	7 (36,8 %)	19 (100,0 %)
Gesamt	21 (52,5 %)	19 (47,5 %)	40 (100,0 %)

Tabelle 78: De-novo-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit von p16^{INK4a}-Signalverlust; p=0,225

p16 ^{INK4a} -Signalverlust	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
Ja	6 (37,5 %)	10 (62,5 %)	16 (100,0 %)
Nein	10 (33,3 %)	20 (66,6 %)	30 (100,0 %)
Gesamt	16 (34,8 %)	30 (65,2 %)	46 (100,0 %)

Tabelle 79: Ex-Adenom-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit von p16^{INK4a}-Signalverlust; p=1,000

p16 ^{INK4a} -Signalverlust	p16 ^{INK4a} -Expression (Cut-off =)		
	Negativ	Positiv	Gesamt
Ja	3 (25,0 %)	9 (75,0 %)	12 (100,0 %)
Nein	2 (40,0 %)	3 (60,0 %)	5 (100,0 %)
Gesamt	5 (29,4 %)	12 (70,6 %)	17 (100,0 %)

Tabelle 80: Dünndarmkarcinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit von und p16^{INK4a}-Signalverlust; p=0,600

3.5.6.2 p16^{INK4a}-Expression und MSI-Alterationen

Bei **Papillenkarcinomen** zeigte die Hälfte der Fälle mit LOH in mindestens einem der Marker einen gleichzeitigen p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Es bestand jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und Mikrosatellitenalteration in mindestens einem der Marker (p= 0,387; n=108; Tabelle 81). **De-novo-Papillenkarcinome** hatten in allen Fällen mit LOH in mindestens einem der Marker einen gleichzeitigen p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Dieser Zusammenhang war signifikant (p=0,010; n=54; Tabelle 82). **Ex-Adenom-Papillenkarcinome** zeigten nur in 30 % der Fälle mit LOH in mindestens einem der Marker (p= 0,739; n=54, Tabelle 83), **Dünndarmkarcinome** in 40,0 % der Fälle mit LOH in mindestens einem der Marker einen gleichzeitigen p16^{INK4a}-Verlust. Der Zusammenhang war jedoch ebenfalls nicht signifikant (p=0,834; n=21; Tabelle 84).

Alteration in mindestens 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
ROH	41 (46,0 %)	48 (54,0 %)	89 (100,0 %)
MSI	4 (80,0 %)	1 (20,0 %)	5 (100,0 %)
LOH	7 (50,0 %)	7 (50,0 %)	14 (100,0 %)
Gesamt	52 (48,2 %)	56 (51,8 %)	108 (100,0 %)

Tabelle 81: Papillenkzinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus; p=0,387

Alteration in mindestens 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
ROH	21 (44,7 %)	26 (55,3 %)	47 (100,0 %)
MSI	3 (100,0 %)	0 (100,0 %)	3 (100,0 %)
LOH	4 (100,0 %)	0 (100,0 %)	4 (100,0 %)
Gesamt	28 (51,9 %)	26 (48,1 %)	54 (100,0 %)

Tabelle 82: De-novo-Papillenkzinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus; p=0,010

Alteration in mindestens 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
ROH	20 (47,6 %)	22 (52,4 %)	42 (100,0 %)
MSI	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	2 (100,0 %)
LOH	3 (30,0 %)	7 (70,0 %)	10 (100,0 %)
Gesamt	24 (44,4 %)	30 (55,6 %)	54 (100,0 %)

Tabelle 83: Ex-Adenom-Papillenkzinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus; p=0,739

Alteration in mindestens 1 Marker	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Negativ	Positiv	Gesamt
ROH	3 (30,0 %)	7 (70,0 %)	10 (100,0 %)
MSI	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	6 (100,0 %)
LOH	2 (40,0 %)	3 (60,0 %)	5 (100,0 %)
Gesamt	6 (28,6 %)	15 (71,4 %)	21 (100,0 %)

Tabelle 84: Dünndarmkarzinome: p16^{INK4a}-Expressionsverlust in Abhängigkeit vom Mikrosatelliten-status; p=0,834

3.5.7 p16^{INK4a}-Expression und Methylierung

Zwischen p16^{INK4a}-Expression und Methylierung bestand bei **Papillenkarcinomen** ein signifikanter Zusammenhang (p=0,038; n=19; Tabelle 85). Bemerkenswert ist der Unterschied zwischen den Entitäten: während bei **De-novo-Karzinomen** kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Verlust und Methylierung bestand (p=1,000; n=4; Tabelle 86), war er bei **Ex-Adenom-Karzinomen** signifikant (p=0,004; n=15; Tabelle 87). Bei **Dünndarmkarzinomen** war kein Zusammenhang nachweisbar (p=1,000; n=5; Tabelle 88).

Methylierungsstufen	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Nein	Ja	Gesamt
Nur unmethyliert	3 (21,4 %)	11 (78,6 %)	14 (100,0 %)
Wenig methyliert	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
Zur Hälfte methyliert	2 (100,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
Vollständig methyliert	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	2 (100,0 %)
Gesamt	7 (36,8 %)	12 (63,2 %)	19 (100,0 %)

Tabelle 85: Papillenkarzinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus; p=0,038

Methylierungsstufen	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Nein	Ja	Gesamt
Nur unmethyliert	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100,0 %)
Wenig methyliert	-	-	-
Zur Hälfte methyliert	-	-	-
Vollständig methyliert	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)	1 (100,0 %)
Gesamt	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (100,0 %)

Tabelle 86: De-novo-Papillenkarzinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus; p=1,000

Methylierungsstufen	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Nein	Ja	Gesamt
Nur unmethyliert	1 (9,1 %)	10 (90,9 %)	11 (100,0 %)
Wenig methyliert	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
Zur Hälfte methyliert	2 100,0 %)	0 (0,0 %)	2 (100,0 %)
Vollständig methyliert	1 100,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
Gesamt	5 (33,3 %)	10 (66,6 %)	15 (100,0 %)

Tabelle 87: Ex-Adenom-Papillenkarcinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus; p=0,004

Methylierungsstufen	p16 ^{INK4a} -Expression		
	Nein	Ja	Gesamt
Nur unmethyliert	1 (100,0 %)	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)
Wenig methyliert	-	-	-
Zur Hälfte methyliert	2 (33,3)	1 (66,7)	3 (100,0 %)
Vollständig methyliert	0 (0,0 %)	1 (100,0 %)	1 (100,0 %)
Gesamt	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (100,0 %)

Tabelle 88: Dünndarmkarzinome: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus; p=1,000

4 DISKUSSION

4.1 FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG

4.1.1 UroVysion[®]-Färbung von TMA-Schnitten

In dieser Arbeit wurden erstmals Tissue-Mikro-Arrays von Papillen- und Dünndarmtumoren unter Verwendung des kommerziell erhältlichen UroVysion[®]-Kit auf p16^{INK4a}-Signalverlust untersucht. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von histologischen Schnitten ist ein anspruchsvolles Verfahren, das sowohl bei der UroVysion[®]-Färbung als auch bei der Auswertung ein modifiziertes Vorgehen notwendig machte. Ursachen hierfür sind Verlust des Genorts durch Anschneiden von Zellkernen¹⁴¹, DNA-Kondensation und Größenunterschiede der Tumorzellkerne^{117, 141-143} sowie eine geringere Effizienz der Färbung in formalinfixiertem Gewebe¹¹⁷. Für die Auswertung der einzelnen Tumorproben wurden daher anhand von Normalgewebe Scores berechnet, die die durchschnittlich geringere Anzahl von p16^{INK4a}-Signalen in formalinfixiertem Gewebeschnitten berücksichtigen.^{117, 138, 144} In dieser Arbeit wurde ausgehend vom durchschnittlichen p16^{INK4a}-Signalwert im Normalgewebe +/- der 3-fachen Standardabweichung der Cut-off für p16^{INK4a}-Verlust bei weniger als 1,13 p16^{INK4a}-Signalen pro Zelle definiert.

Eine weitere Besonderheit besteht in der Verwendung von TMAs parallel für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und p16^{INK4a}-Immunhistologie. Vorteile sind eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da alle Gewebeproben unter den exakt gleichen Bedingungen behandelt werden und eine enorme Einsparung an Zeit und Verbrauchsmaterialien, die die aufwendige Herstellung der Arrays bei weitem überwiegen. Letztere wurde zudem durch die Einführung von Tissue Arrayern deutlich erleichtert.

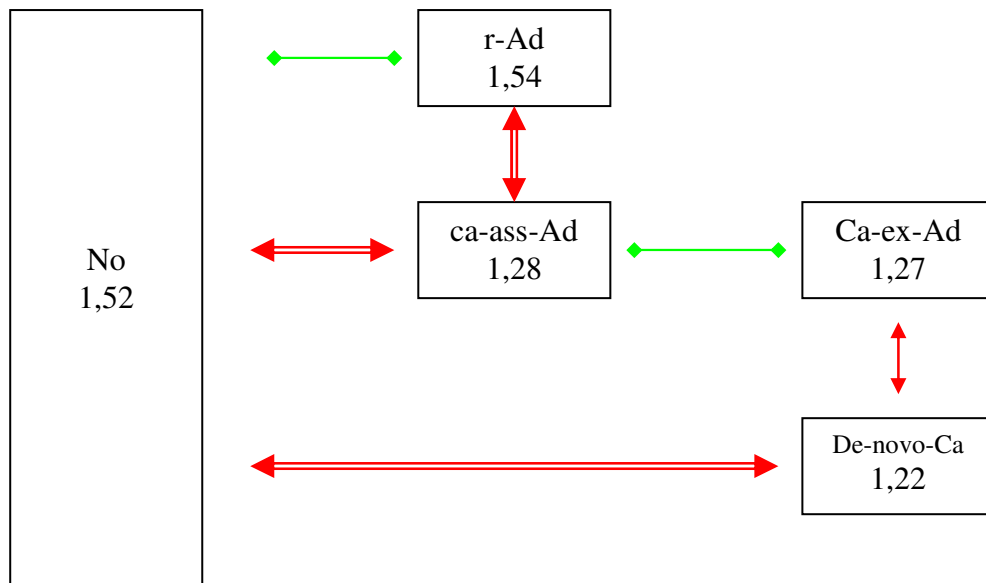


Abbildung 26: Mittelwerte der $p16^{INK4a}$ -Signale in den unterschiedlichen Gewebeentitäten und deren Beziehungen untereinander (grüne Linien mit Punkt: kein signifikanter Unterschied; rote Doppelpfeile: signifikant (einfache Linie) bzw. hochsignifikant (doppelte Linie))

4.1.2 $p16^{INK4a}$ -Signalverlust im Verlauf der Tumorentstehung

Die Bestimmung gewebespezifischer $p16^{INK4a}$ -Mittelwerte der einzelnen Tumorentitäten ergab für karzinomassoziierte Adenome, Ex-Adenom- und De-novo-Karzinome verglichen mit Normalgewebe signifikant niedrigere $p16^{INK4a}$ -Mittelwerte. Während sich reine Adenome nicht von Normalgewebe unterschieden, bestand ein signifikanter Unterschied zu karzinom-assoziierten Adenomen, die wiederum in enger Beziehung zu Ex-Adenom-Karzinomen standen. Die beiden Karzinomentitäten unterschieden sich ebenfalls signifikant (Abbildung 26).

Unter Berücksichtigung der Beziehungen zwischen Normalgewebe, karzinom-assoziierten Adenomen, Ex-Adenom-Karzinomen und De-novo-Karzinomen lässt sich ein Tumormodell entwerfen, das eine Karzinomentstehung entlang zweier unterschiedlicher Wege zeigt.

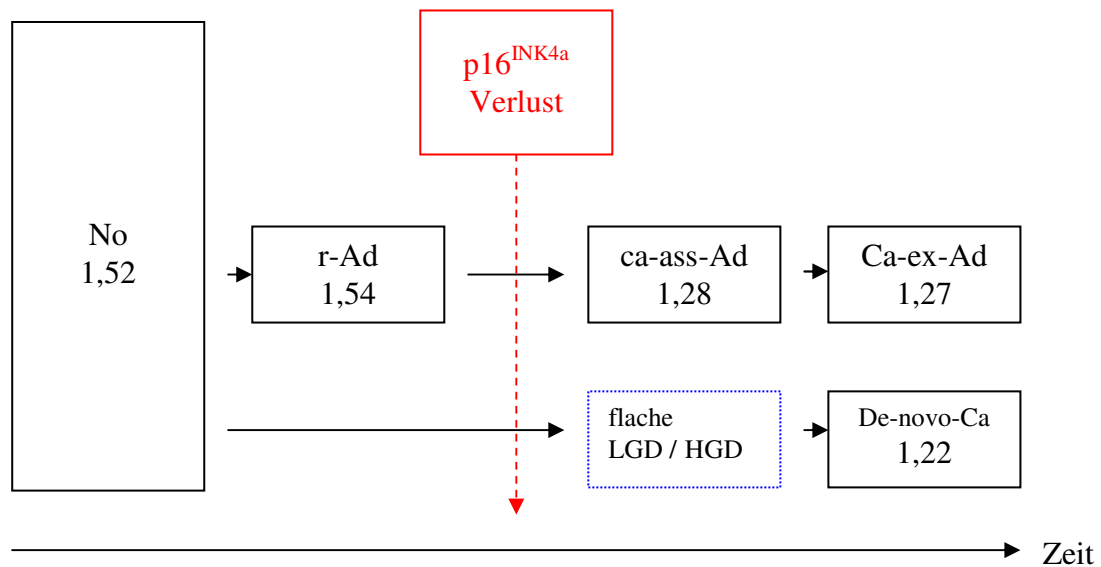


Abbildung 27: De-novo- und Ex-Adenom-Karzinogenese in Abhängigkeit von p16^{INK4a}-Verlust: p16^{INK4a}-Verlust in reinen Adenomen führt zur Ex-Adenom-Karzinogenese, p16^{INK4a}-Verlust in Normalgewebe zur De-novo-Karzinogenese. (flache LGD/HGD: flache Low-grade Dysplasien/ High-grade-Dysplasien)

Der Verlust von p16^{INK4a} in vorbestehenden Adenomen führt zur Ex-Adenom-Karzinogenese, während p16^{INK4a}-Verlust in Normalgewebe zur De-novo-Karzinogenese führt. Die Stellung potentieller prämaligener Vorläuferläsionen von De-novo-Karzinomen lässt sich anhand der Erkenntnisse von Dehaan et al.¹¹⁷ an cholangiozellulärem Gewebe definieren, wo bei ähnlichen p16^{INK4a}-Mittelwerten (Normalgewebe 1,46, Karzinome 1,18 und Dysplasien 1,12 Signale pro Zelle) eine enge Beziehung von Dysplasien und Karzinomen im Vergleich zu Normalgewebe besteht (**Abbildung 27**). Gestützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse von Schwarz et al. an flachen Urothelkarzinomen, die ebenfalls ähnliche Deletionsraten von Hyperplasien, Dysplasien und invasiven Karzinomen, bei gleichzeitig deutlichen Unterschieden zu den Deletionsraten in Normalgeweben, berichten.¹³⁷

4.1.3 Definition von p16^{INK4a}-Signalverlust

Ausgehend vom durchschnittlichen p16^{INK4a}-Signalwert im Normalgewebe +/- der 3-fachen Standardabweichung wurde der Cut-off für p16^{INK4a}-Verlust bei weniger als 1,13 p16^{INK4a}-Signalen pro Zelle definiert. In der Literatur wurden mittlerweile mehrere Scores beschrieben, die jedoch wegen der Verwendung unterschiedlicher Färbungen nicht ohne weiteres übertragbar sind (Tabelle 89).

Autor	Gewebe	Färbung	Definition p16 ^{INK4a} -Signalverlust
Dehaan et al. ¹¹⁷	Cholangiozelluläre Karzinome	Urovysion®	<ul style="list-style-type: none"> - einfache Deletion: mehr als 54 % der Tumorzellen haben nur ein Signal - doppelte Deletion: mehr als 23 % der Tumorzellen haben kein p16^{INK4a}-signal
Schwarz et al. ¹³⁸	Flache Urothelkarzinome	Urovysion®	<ul style="list-style-type: none"> - relative Deletion: mindestens 1 p16^{INK4a}-Signal weniger als Zentromersignale - Tumordeletion: mehr als 14 % der Zellen weisen relative Deletion auf -
Uzawa et al. ¹⁴⁵	Orale Plattenepithelkarzinome	Kit mit Kombination von p16 ^{INK4a} -Sonde und Zentromersonde für Chromosom 9	<ul style="list-style-type: none"> - Verhältnis von p16^{INK4a}-Signalen zu Zentromersignalen d. Chr. 9 an Normalgeweben bestimmt - Cut-off: anhand 3facher Standardabweichung errechnet: <ul style="list-style-type: none"> · Deletion bei <1,751 p16^{INK4a}-Signale pro Zellkern oder · Deletion bei p16^{INK4a}-Chromosom-9-Ratio < 0,889
Schwarz et al. ¹⁴⁶	Orale Plattenepithelkarzinome	Kombination aus 9p16 ^{INK4a} -Sonde, 3p14-Sonde, Zentromersonden für Chromosom 9 und Chromosom 3	<ul style="list-style-type: none"> - Deletion: mehr als 13 % der Zellen eines Tumors zeigt p16^{INK4a}-Signalverlust - Cut-off anhand 3facher Standardabweichung von Normalgewebe errechnet

Tabelle 89: Aufstellung unterschiedlicher p16^{INK4a}-Auswertungen

Um zu überprüfen, inwieweit sich bei UroVysion®-Färbung die Ergebnisse bei Verwendung unterschiedlicher Scores voneinander unterscheiden, wurde unter der Annahme ähnlicher histologischer Eigenschaften bei einer Stichprobe von 66 Fällen die p16^{INK4a}-Deletionsrate nach der Methode von Dehaan bestimmt (Tabelle 90): Die Frage nach Vorliegen einer Deletion (ohne Unterscheidung nach doppelten oder einfachen Deletionen) wurde in beiden Auswertungen zu 100% gleich beantwortet. Unterscheidet man nicht nach dem Grad der Deletion, so kommt bei Dehaan et al. ein p16^{INK4a}-Verlust in 59,1 % (n=23) der cholangiozellulären Karzinome vor. Die in dieser Arbeit untersuchten Papillenkarzinome liegen mit p16^{INK4a}-Verlust in 40,6 % (n=96) zwischen cholangiozellulären Karzinomen und Dünndarmkarzinomen mit p16^{INK4a}-Verlust in 28,6 % (n=52).

Subjekt. Eindruck: Anzahl an Signalen	Anzahl	Deletion (Mittelwert p16 ^{INK4a} <1,13)	Deletion nach Kriterien von Dehaan et al. ¹¹⁷
2	46	nein	nein
	1	ja	ja, doppelt
1	3	nein	nein
	8	ja	ja, einfach
0	8	ja	ja, doppelt
Summe	66		

Tabelle 90: Nachauswertung von 66 Papillen- und Dünndarmkarzinomen

4.2 MIKROSATELLITENALTERATION UND P16^{INK4a}-SIGNALVERLUST

4.2.1 Gegenüberstellung der Methoden

Obwohl FISH und MSI-Analyse Deletionen im Chromosomenabschnitt 9p nachweisen und dadurch Hinweise auf mögliche Alterationen des p16^{INK4a}-Gens geben, müssen wesentliche Unterschiede beachtet werden. Während die MSI-Analyse seit langem zur Untersuchung von Deletionen im Chromosomenabschnitt 9p verwendet und LOH einheitlich definiert wird, ist die Untersuchung von histologischen Präparaten mittels FISH eine neue Methode mit unterschiedlichen Auswertungskonzepten. Sie erlaubt je nach Ansatz die Betrachtung innerhalb eines Tumoreals gelegener Subpopulationen oder z.B. die direkte Gegenüberstellung von Tumorgewebe mit Normalgewebe. Um technischen Problemen in histologischen Schnitten zu begegnen, werden anstelle des direkten Vergleiches von Tumor und zugehörigem Normalgewebe jedoch meist Scores errechnet, die sich an den Durchschnittswerten mehrerer Normalgewebeproben orientieren.^{117, 137, 141}

Das Prinzip der MSI-Analyse hingegen beruht auf dem direkten Vergleich von Tumor und zugehörigen Normalgewebe. Eine Unterscheidung von Subpopulationen ist zwar prinzipiell möglich, üblicherweise werden jedoch für eine optimale DNA-Ausbeute möglichst große Tumoreale für die DNA-Isolierung und anschließende MSI-Analyse mikrodissiziert. Zudem ist bei Verwendung von TMAs mit einem Stanzdurchmesser von nur 0,6 mm die Größe der untersuchten Zellpopulationen wesentlich kleiner als die der mikrodisszierten Tumoreale. Auch die Länge der untersuchten Gensequenzen unterscheidet sich deutlich: Während die untersuchten Mikrosatelliten eine Länge von ca. 150-200 Basen aufweisen¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, beträgt die Länge des LSI-p16^{INK4a}-Markers gold im UroVysion®-Kit ca 220.000 Basen¹⁵⁰ und umfasst, wie in Abbildung 28 demonstriert, sowohl das p16^{INK4a}-Gen als auch mehrere Mikrosatellitenmarker^{150, 151}, jedoch nicht D9S304 und pky 11 (D9S1751).

Neueste Ergebnisse von Savola et al.¹⁵² zeigen, dass Deletionen einer Größe von 58 Kilobasen durch den p16^{INK4a}-Marker LSI orange (Länge ca. 180 Kilobasen) nicht erkannt werden. Die Deletion eines Mikrosatellitenmarkers innerhalb des Bereichs der FISH-Sonde muss sich folglich nicht immer als p16^{INK4a}-Signalverlust zeigen. Eine Möglichkeit, eine direkte Korrelation zwischen den beiden Methoden herzustellen, wäre die Verwendung einer großen Anzahl über den gesamten Bereich der FISH-Sonde verteilten Mikrosatellitenmarker. Ein solches Vorgehen wäre bei der großen Anzahl an Tumorproben jedoch nur unter Verwendung fluoreszenzmarkierter MS-Marker möglich, da die MSI-Analyse mittels PAA-Gelen sehr aufwendig ist. Neben einer insgesamt größeren Sensitivität könnten durch

dieses Vorgehen wie bei Okami et al.¹⁵³ zusätzlich auch homozygote Deletionen erfasst werden. In dieser Arbeit wurden zwei zur Analyse des Chromosomenabschnitts 9p besonders gut geeignete Marker verwendet. Pky11 (D9S1751) zeigte in einer Arbeit von Tannapfel et al.¹⁰⁴ die höchste LOH-Frequenz.

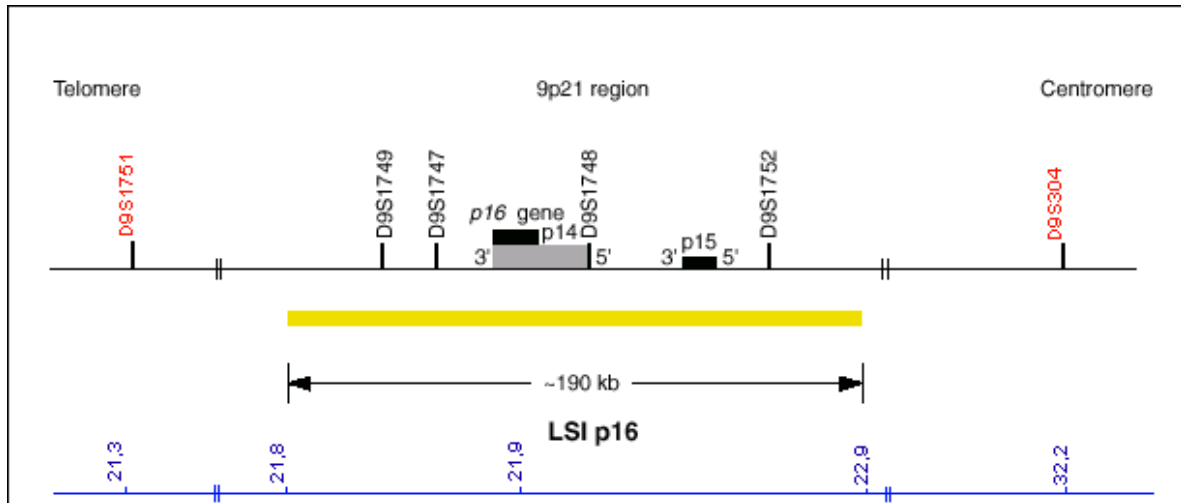


Abbildung 28: Mikrosatellitenmarker und p16^{INK4a}-Gen im Chromosomenabschnitt 9p (modifiziert nach ^{151, 154}: blaue Skala: Position auf dem Chromosom in Megabasen, in dieser Arbeit verwendete Marker rot markiert, LSI: Locus-specific Identifier, D9S1751 entspricht pky 11)

4.2.2 Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen

Der Vergleich der Ergebnisse von MSI-Analysen der einzelnen Veröffentlichungen wird erschwert durch die Verwendung unterschiedlicher Marker-Anzahlen und -Kombinationen sowie der Verwendung der sensitiveren Auswertungsmethode mit fluoreszenzmarkierten Markern anstatt einer Silberfärbung von PAA-Gelen. Die Häufigkeit von LOH bei Papillenkarzinomen (15,0 %) liegt in der selben Größenordnung wie bei einer Veröffentlichung von Kim et al.¹⁵⁵: unter Verwendung von 4 MS-Markern wurden LOH in 12,5 % (n=9) der Fälle ermittelt. LOH bei Dünndarmkarzinomen lagen bei Kim et al.¹⁵⁵ mit 33 % (n=9) gegenüber 21,4 % etwas höher. Unter Verwendung von 4 fluoreszenzmarkierten MS-Markern traten in einer Arbeit von Ueki et al. LOH bei Papillenkarzinomen in 50,0 % (n=16), bei extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=51) in 57,1 % und bei Gallenblasenkarzinomen (n=44) in 72,7 % auf. Im Vergleich dazu betrug die Häufigkeit von 9p-Alterationen bei extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=21) unter Verwendung von 3 Mikrosatellitenmarker in einer Arbeit von Caca et al.⁷⁸ 62 %. Diese Deletionsraten lagen ungefähr in der Größenordnung für p16^{INK4a}-Signalverlust bei extrahepatischen Cholangiokarzinomen von Dehaan (59,1 %; n=22, keine Unterscheidung in doppelte oder einfache Deletion) und et-

was über der p16^{INK4a}-Deletionsrate von Papillenkarzinomen in dieser Untersuchung (40,6 %, n=96).

Die Untersuchungen von intrahepatischen Cholangiokarzinomen durch Tannapfel et al.¹⁰⁴ ergaben unter Verwendung von 9 fluoreszenzmarkierten Markern LOH in 19,5 % von 41 intrahepatischen Cholangiokarzinomen. Im Vergleich dazu berichten Tannapfel et al.¹⁵⁶ in einer anderen Arbeit ebenfalls unter Verwendung von 9 fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenmarkern LOH in 16 % von 51 intrahepatischen Cholangiokarzinomen. Im Vergleich zur Untersuchung von Gallenblasenkarzinomen durch Ueki et al.⁷⁶ (n=44), in der unter Verwendung von 4 MS-Marker LOH in 72,7 % detektiert wurden, konnten bei der Untersuchung mit 5 fluoreszenzmarkierten Markern bei Tadokoro et al.¹⁵⁷ LOH in 56,9 % festgestellt werden (n=51).

4.2.3 Vergleich der Ergebnisse von FISH und MSI-Analyse

In der MSI-Analyse und der FISH unterschieden sich De-novo-Papillenkarzinome signifikant von De-novo-Dünndarmkarzinomen. Während die FISH signifikant häufigere p16^{INK4a}-Signalverluste bei De-novo-Papillenkarzinomen (p=0,037, n=55) ergab, wurden LOH in der MSI-Analyse signifikant (p= 0,007; n=81) häufiger bei De-novo-Dünndarmkarzinomen gefunden. Der Vergleich von De-novo- und Ex-Adenom-Papillenkarzinomen zeigte in der FISH tendenziell häufigeren p16^{INK4a}-Verlust bei De-novo-Karzinomen (p=0,41; n=96), während die MSI-Analyse signifikant häufigere LOH bei Ex-Adenom-Karzinomen ergab (p=0,042; n=133). Bei Dünndarmkarzinomen wiederum war p16^{INK4a}-Signalverlust tendenziell häufiger bei Ex-Adenom-Karzinomen (p=0,063, n=21), während LOH signifikant häufiger bei den De-novo-Karzinomen (p=0,004; n=28) auftraten. Die inversen Ergebnisse beider Methoden legen nahe, dass FISH und MSI-Analyse bei der in dieser Arbeit verwendeten Markerkombination komplementäre Methoden zur Erfassung von 9p-Alterationen darstellen. Dies wird auch bei direkter Korrelation der Ergebnisse von FISH und MSI-Analyse deutlich: Bei Papillenkarzinomen findet sich nur in 9,4 % (n=32) der Fälle mit p16^{INK4a}-Signalverlust in der FISH gleichzeitig auch LOH. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die räumliche Beziehung von p16^{INK4a}-Sonde und Marker sein (vgl. Abb. 30), da sich beim noch weiter von der FISH-Sonde entfernten Marker D9S304 in keinem der 35 Fälle mit p16^{INK4a}-Verlust LOH finden. Bei den Dünndarmkarzinomen kam LOH beim Marker pky 11 in 1 von 5 Fällen (20 %) mit p16^{INK4a}-Signalverlust vor, während bei D9S304 in 2 von 6 Fällen (33,3 %) Übereinstimmung bestand.

Möglicherweise wurden durch die Mikrosatellitenanalyse bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen unterschiedliche 9p-Alterationen erfasst. Ein Hinweis darauf könnte sein, dass, obwohl 9p-Deletionen insgesamt häufiger in der FISH als in der MSI-Analyse ermittelt wurden, bei De-novo-Dünndarmkarzinomen LOH sehr viel häufiger als p16^{INK4a}-Signalverlust war. Eine Ursache hierfür könnte bei Dünndarmkarzinomen die Alteration eines anderen Tumorgens außerhalb des Bereichs der p16^{INK4a}-Sonde sein. Nach Überprüfung der Gendatenbank Entrez Gene ¹⁵¹ kommen in der Nähe des Markers pky 11 das MTAP-Gen ¹⁵⁸ und im Bereich des Markers D9S304 das Onkogen BAG1 (BCL2 associated athanogene) ¹⁵⁹ in Frage.

4.3 METHYLIERUNG

4.3.1 Häufigkeit von Methylierung

Die Methylierungsanalysen zeigten eine signifikant unterschiedliche Häufigkeitsverteilung des Methylierungs-Ausmaßes bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen.

Im Vergleich zu Papillenkarzinomen, bei denen nur 16,6 % halb oder vollständig methyliert waren, war dies bei Dünndarmkarzinomen mit 85,6 % sehr viel häufiger der Fall. Ähnliche Ergebnisse berichten Kim et al. ¹²⁰, die ebenfalls eine tendenziell größere Methylierungshäufigkeit bzw. Methylierungsdichte bei Dünndarmkarzinomen (47,7 %; n=12) verglichen mit Papillenkarzinomen (22,2 %; n=9) und extrahepatischen Gallengangskarzinomen (23,5 %; n=18) fanden. Zusätzlich zeigten Karzinome verglichen mit ihren Normalgeweben eine signifikant häufigere Methylierung. Der qualitative Vergleich der Methylierungshäufigkeiten von Karzinomen in der Region der Papilla vateri ergab in dieser Arbeit einen signifikanten, bei Kim et al. ¹²⁰ einen tendenziellen Unterschied zwischen Dünndarm- und Papillenkarzinomen. Zwischen Papillenkarzinomen und extrahepatischen Gallengangskarzinomen bestanden keine wesentliche Unterschiede. Im Gegensatz dazu waren in der Untersuchung von Ueki et al. ⁷⁶ Papillenkarzinome (n=15) tendenziell häufiger methyliert als extrahepatische Cholangiokarzinome (n=31). Zwischen extra- und intrahepatischen Gallengangskarzinomen bestand bei Yang et al. kein wesentlicher Unterschied ¹¹⁹ (n=36). Die höchsten Methylierungsraten von Dünndarm-, Papillen-, und Gallenwegskarzinomen wiesen Gallenblasenkarzinome auf. ^{76, 157} Eine Übersicht gibt Tabelle 91.

Autor	Gewebe	Methylierung	n
Brücher et al. ¹¹⁸	Dünndarmkarzinome	30,6 %	49
Kim et al. ¹²⁰	Dünndarmkarzinome	47,7 %	12
	Papillenkarzinome	22,2 %	9
	extrahepatische Cholangiokarzinome	23,5 %;	18
Ueki et al. ⁷⁶	Papillenkarzinome	40,0 %	15
	extrahepatische Gallengangskarzinome	16,1 %	31
	Gallenblasenkarzinome	72,7 %	44
Tadokoro et al. ¹⁵⁷	Gallenblasenkarzinome	72,5 %	51
Hong et al. ⁷⁷	extrahepatische Gallengangskarzinome	76,7 %	90
Caca et al. ⁷⁸	extrahepatische Gallengangskarzinome	42 %	21
Yang et al. ¹¹⁹	extrahepatische Gallengangskarzinome	54,3 %	19
	intrahepatische Gallengangskarzinome	48,6 %	17
Tannapfel, Behnicke et al. ¹⁰⁴	intrahepatische Gallengangskarzinome	82,9 %	41
Tannapfel, Sommerer al. ¹⁵⁶	intrahepatische Gallengangskarzinome	76 %	51

Tabelle 91: Häufigkeit aberranter p16^{INK4a}-Methylierung bei Dünndarm-, Papillen- und Gallengangs-karzinomen

4.3.2 Methylierung und genetische Alterationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten erwartungsgemäß ein unabhängiges Auftreten von Promotormethylierung und Mikrosatellitenalterationen sowie Promotormethylierung und p16^{INK4a}-Signalverlust. Besonders deutlich wurde dies in der Gruppe der Papillenkarzinome, bei denen LOH nur bei nicht-methylierten Tumoren auftrat. Caca et al.⁷⁸ berichten hingegen von Mikrosatellitenalteration in 88,9 % von Fällen mit Methylierung (n=9).

4.4 AUSWIRKUNGEN (EPI-)GENETISCHER ALTERATIONEN

4.4.1 Histologische Subtypen

Der Vergleich der histologischen Subtypen von **Papillenkarcinomen** zeigte in der MSI-Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen intestinale und intestinal-muzinösem Subtyp einerseits sowie pankreatobiliären, G3-Adenokarcinomen und invasiv-papillären Karcinomen andererseits. Die FISH hingegen ergab keine signifikanten Unterschiede. Die histologischen Subtypen von **Dünndarmkarcinomen** unterschieden sich in der FISH, MSI-Analyse und p16^{INK4a}-Expressionsbestimmung nicht.

Ueki et al.⁷⁶ (n=90) konnten bei Papillen- und Gallengangskarcinomen im Gegensatz zu Gallenblasenkarcinomen keine Übereinstimmung von p16^{INK4a}-Alteration (Mutationsanalyse, MSI-Analyse, Methylierung) mit histologischen Subtypen feststellen. Die histologische Klassifikation unterschied sich jedoch von der in dieser Arbeit verwendeten. Bislang gibt es keine Veröffentlichungen über den Zusammenhang von p16^{INK4a}-Signalverlust und p16^{INK4a}-Expressionsverlust mit histologischen Subtypen von Papillenkarcinomen.

4.4.2 Klinisch-pathologische Variablen und Überleben

Bei **Papillen- und Dünndarmkarcinomen** bestanden keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Tumorstadien, Grading, pT-Stadium und Nodalstatus mit (epi-)genetischen 9p-Alterationen in FISH, MSI-Analyse und Methylierungsanalyse. Beim Überleben zeigten sich uneinheitliche Ergebnisse. p16^{INK4a}-Signalverlust und Methylierung führten bei Papillen- und Dünndarmkarcinompatienten zu tendenziell kürzerem, 9p-LOH zu einem tendenziell längerem Überleben.

Bei Kim et al.¹¹⁸ (n=39) bestand bei Papillen-, Dünndarm- und extrahepatischen Gallengangskarcinomen kein Zusammenhang von p16^{INK4a}-Methylierung mit Patientenalter oder Geschlecht. Papillen- und Gallengangskarcinome zeigten bei Ueki et al.⁷⁶ (n=90) ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Alteration (Gensequenzierung, MSI-Analyse,

Methylierung) und klinisch-pathologischen Variablen (Alter, Geschlecht, Histotyp, TNM-Stadium) sowie Überleben. Tendenziell war das Überleben bei Papillen- und extrahepatischen Gallengangskarzinomen mit p16^{INK4a}-Alteration schlechter.

Bei Gallenblasenkarzinomen hingegen bestand ein signifikant besseres Überleben in der Gruppe ohne p16^{INK4a}-Alteration (Sequenzierung, MSI-Analyse, Methylierung) sowie ein signifikanter Zusammenhang mit histologischen Subtypen. Mit weiteren klinisch-pathologischen Variablen (Alter, Geschlecht, TNM-Stadium) bestand kein Zusammenhang. Tadokoro et al.¹⁵⁷ (n=51) fanden bei Gallenblasenkarzinomen keinen Zusammenhang zwischen LOH und Alter, Geschlecht, histologischen Subtyp, UICC-Stadium, T-Stadium sowie Nodalstatus.

Die Untersuchung extrahapatischer Cholangiokarzinome durch Hong et al.⁷⁷ (n=90) ergab einen signifikanten Zusammenhang von Hypermethylierung und Gefäßinvasion. Weitere klinisch-pathologische Variablen (Geschlecht, Wachstumsmuster, Tumorgröße, Tiefe der Tumordinvasion, Lymphknotenstatus und UICC-Stadiengruppierung) und das Überleben waren unabhängig von p16^{INK4a}-Hypermethylierung. Patienten mit methylierten Karzinomen überlebten tendenziell kürzer. Bei der Untersuchung von p16^{INK4a}-Expressionsverlust kombiniert mit p16^{INK4a}-Hypermethylierung ergab sich ein signifikanter Zusammenhang mit Lymphknotenmetastasierung und Stadiengruppierung, jedoch nicht mit der Tiefe der Tumordinvasion oder Überleben. Die Untersuchungen von intrahepatischen Cholangiokarzinomen zeigte keinen Zusammenhang zwischen Promotormethylierung mit Tumorstadium und Grading (Tannapfel et al., n=41)¹⁰⁴ bzw. Differenzierungsgrad und Geschlecht (Yang et al., n=36).¹¹⁹

4.5 IMMUNHISTOLOGIE

4.5.1 Definition von Cut-offs, Scores und Indices

Bisher existieren keine einheitlichen Auswertungskonzepte und Definitionen für die Auswertung von immunhistochemischen p16^{INK4a}-Färbungen. Während ein Teil der Autoren ausschließlich nukleäre Färbung als spezifisch für p16^{INK4a} anerkennt,^{72, 77, 116, 121, 122, 157} werden in anderen Arbeiten sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Färbung gefordert^{160, 161}, oder es genügt eine zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung^{99, 105, 162} (Tabelle 92). Eine überzeugende Argumentation für die Berücksichtigung der zytoplasmatischen Färbung liefert Ichikawa durch den Verweis auf die Penetrabilität von p16^{INK4a} durch Kernporen.^{115, 163} Bei einigen Auswertungskonzepten wurde zusätzlich auch die Intensität der Färbung miteinbezogen^{103, 162, 164} oder Verteilungsmuster positiv und negativ gefärbter Tumoreareale definiert^{115, 117} (Tabelle 93). Arbeiten mit Fokus auf Erfassung eines p16^{INK4a}-Verlust ermittelten diesen häufig anhand von Cut-offs, während Untersuchungen auf p16^{INK4a}-Überexpression teils komplizierte Scores verwendeten (Tabelle 94). Der Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeiten wird dabei zusätzlich durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden und Antikörper erschwert. Um bei dieser Arbeit sowohl Verlust der p16^{INK4a}-Expression als auch mögliche Überexpression erfassen zu können, wurden unter Berücksichtigung der Häufigkeit von p16^{INK4a}-Expression in Normalgeweben der Cutoff für p16^{INK4a}-Verlust bei 0 % und für Überexpression bei mehr als 70 % p16^{INK4a}-exprimierenden Zellen innerhalb einer Gewebestanze gewählt.

Autor	Gewebe	Ort der Färbung	Färbung
Chapman ⁷⁵	Urothel-Ca	Keine Angabe	negative/heterogene/starke Expression in mindestens 50 % der Tumorzellen
Parwani ¹¹⁶	Gallenblasen-Ca	Nukleus	positiv: diffuse oder mosaikartige nukleäre Färbung
Rosty ¹²¹	pankreatische intraepitheliale Neoplasien	Nukleus	positiv: nukleäre Färbung über jeglichem zytoplasmatischen Hintergrund
Maitra ¹²²	pankreatische intraepitheliale Neoplasien	Nukleus	negativ: komplettes Fehlen von nukleärer p16 ^{INK4a} -Expression
Sasaki ¹⁶⁰	Gallengangs-Ca	Nukleus und Zytoplasma	positiv: mehr als 5 % der Zellen zeigen ein p16 ^{INK4a} -Immunhisto-Signal
Hong ⁷⁷	extrahepatische Gallengangs-Ca	Nukleus	positiv: nukleäre Färbung für p16 ^{INK4a}
Geradts ⁷²	Zelllinien, Pankreas-Adeno-Ca und NSCLC	Nukleus	positiv: nukleäre Färbung vor jeglichem zytoplasmatischen Hintergrund
Tannapfel ^{104, 165}	Zellkulturen und Gallengangs-Ca	Nukleus	positiv: mindestens 10% der Zellkerne gefärbt
Tadokoro ¹⁵⁷	Gallenblasen-Ca	Nukleus	- : 0-10 % + : 10-25 % ++ : 25-50 % +++ : 25-100 % Tumor negativ bei -, positiv bei +, ++, +++

Tabelle 92: Auswertung der immunhistochemischen p16^{INK4a}-Expression: Definitionen von „positiver“ und „negativer“ Färbung

Autor	Gewebe	Ort der Färbung	Intensität	Prozentsatz positiver Zellen	Cut-off/Index
Schneider-Stock ¹⁰⁵	Gastro-intestinale Stroma-Tumoren	Nukleus mit oder ohne Zytoplasma		0-10 % keine Färbung 11-20 % schwache Färbung 21-50 % mittlere Färbung 50-100 % starke Färbung	Cut-off: 20 %
Salvesen ¹⁰³	Endometrium	Nukleus	0-3	0: 0 % 1: <10 % 2: 10-50 % 3: >50 %	Färbeindex = Intensität x Prozentsatz Cut-off : Färbeindex <4
Schorge ¹⁶⁴	Endometrium	Keine explizite Angabe	0 keine 1-3 Schwach -stark	1: <5 % 2: 6-25 % 3: 26-50 % 4: 51-75 % 5: >75 %	Färbeindex = Intensität + Prozentsatz
Cui ¹⁶⁶	Colonkarzinom	Nukleus	-	- : 0% + : 1-80 % ++ : >80 %	0: Verlust + : Normal ++ : Über- Expression
Wassermann ¹⁷⁶	Colonkarzinom	Kein explizite Angabe	1 keine - schwach 2 mittel 3 stark	1: ≤ 50 p16 ^{INK4aA} -positive Zellen oder Zellcluster 2: >50 p16 ^{INK4aA} -positive Zellen oder Zellcluster in 10 Ge- sichtsfeldern bei 250facher Vergrößerung	Färbeindex = Intensität x Prozentsatz 1-3: niedrige 4-6: hohe Expression

Tabelle 93: Auswertung der immunhistochemischen p16^{INK4a}-Expression: Beispiele für Scoring, Indices und Cut-offs

Autor	Gewebe	Nukleus/ Zytoplasma	Färbung
Dehaan ¹¹⁷	cholangiozelluläre Karzinome und Dysplasien	Nukleus im Verhältnis zu Zytoplasma	Positiv: nukleäre Färbung mit höherer Intensität als die zytoplasmatische Färbung Unterscheidung von 1. diffuser Färbung (homogen im ganzen Tumor) 2. „fleckförmige“ Färbung (Areale mit positiver oder negativer Färbung innerhalb des Tumors)
Ichikawa ¹¹⁵	Extrahepatische Cholangiozelluläre Karzinome, Zelllinien	Nukleus und/oder Zytoplasma	Positiv: p16 ^{INK4a} -Expression in Nukleus und/oder Zytoplasma Unterscheidung von 1. U(pregulated) Gruppe: Diffuser Typ 2. D(ownregulated) Gruppe: Heterogener Typ

Tabelle 94: Auswertung der immunhistochemischen p16^{INK4a}-Expression: Beispiele für die Unterscheidung von Expressionsmustern

4.5.2 p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Überexpression im Verlauf der Tumorentstehung

Aus dem immunhistochemischen **p16^{INK4a}-Expressionsverlust** lässt sich wie bei der FISH eine Normal-Adenom-Karzinomsequenz ableiten: Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Normalgewebe (6,8 %) und reinen Adenomen (20,0 %; p=0,08, n=171), letztere waren jedoch signifikant von karzinom-assoziierten Adenomen (44,2 %; p=0,034; n=75) verschieden. Auch karzinom-assoziierte Adenome und Ex-Adenom-Karzinome (40,6 %) p=0,728; n=134) glichen sich. Die Beziehungen der einzelnen Entitäten untereinander zeigt Abbildung 29. **P16^{INK4a}-Überexpression** nahm gegenüber Normalgewebe (0,6 %) bei reinen Adenomen (8,0 %) tendenziell zu (p=0,056). Karzinom-assoziierte Adenome (2,8 %) zeigten tendenziell seltener p16^{INK4a}-Überexpression. Auf dem Weg zu Ex-Adenom-Karzinomen (10,9 %) stieg der Anteil der überexprimierenden Karzinome wieder an (p=0,162; n=134). Zwischen Ex-Adenom-Karzinomen und De-novo-Karzinomen (10,3 %) bestand kein Unterschied (p=1,000; n=170).

Insgesamt lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass im Verlauf der Tumorprogression der p16^{INK4a}-Verlust und der Prozentsatz an p16^{INK4a}-positiven Zellen zunehmen. Der Verlust von p16^{INK4a}-Genorten z.B. vom reinen Adenom zum karzinom-assoziierten Adenom geht einher mit einem Verlust an p16^{INK4a}-Überexpression, der jedoch im weiteren Verlauf wieder zunimmt. De-novo- und Ex-Adenom-Karzinome erreichen dabei ähnliche Werte bei p16^{INK4a}-Expression und p16^{INK4a}-Verlust (Abbildung 29 bis Abbildung 31).

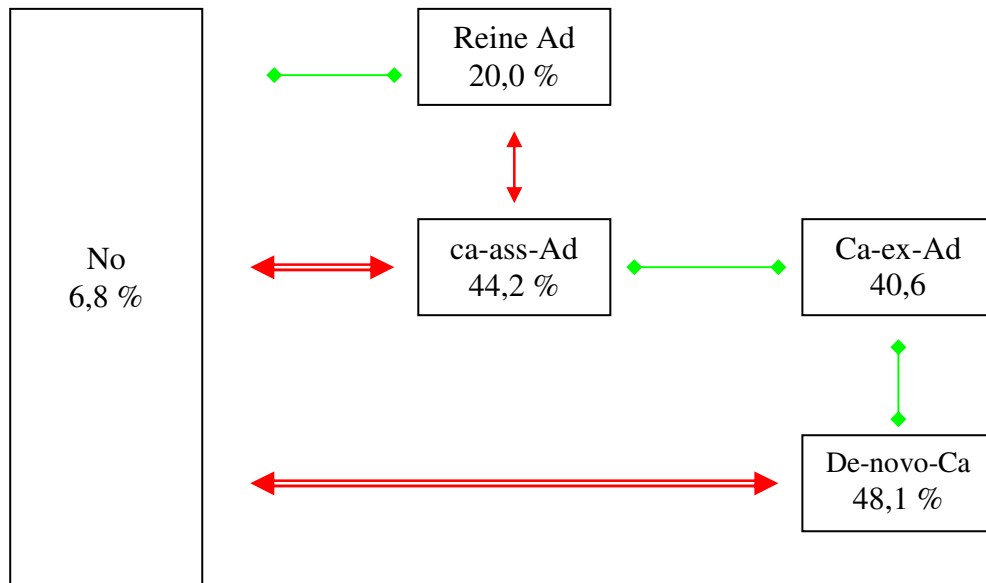


Abbildung 29: p16^{INK4a}-Expressionsverlust: Beziehungen der Gewebeentitäten zueinander (grüne Linien mit Punkt: kein signifikanter Unterschied; rote Doppelpfeile: signifikant (einfache Linie) bzw. hochsignifikant (doppelte Linie))

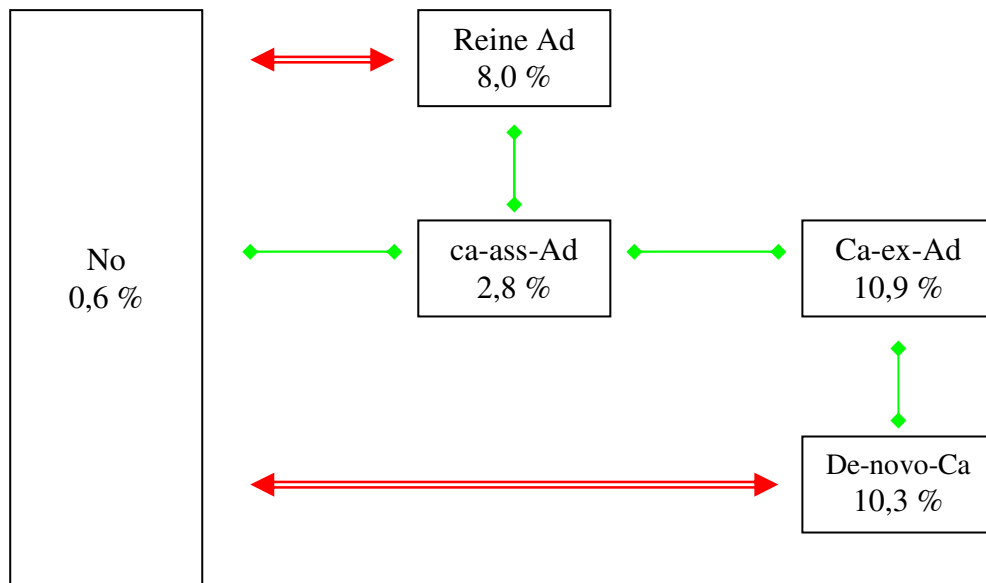


Abbildung 30: p16^{INK4a}-Überexpression: Beziehungen der Gewebeentitäten zueinander (grüne Linien mit Punkt: kein signifikanter Unterschied; rote Doppelpfeile: signifikant (einfache Linie) bzw. hochsignifikant (doppelte Linie))

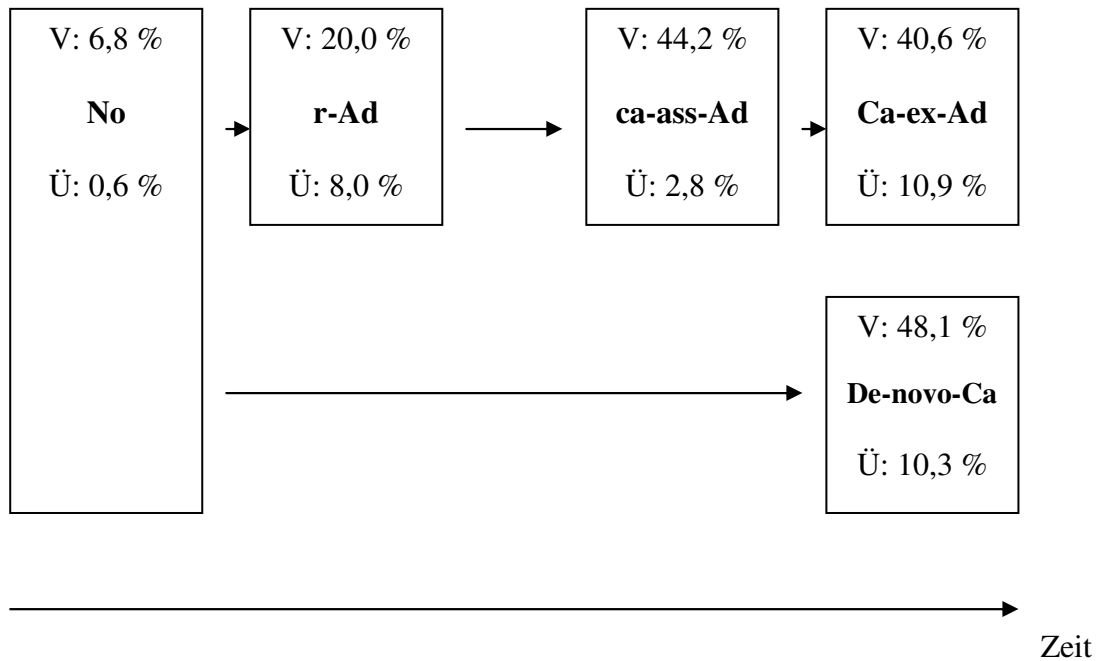


Abbildung 31: De-novo- und Ex-Adenom-Karzinogenese und Veränderung der p16^{INK4a}-Expression
 Mit zunehmender Tumorprogression nimmt p16^{INK4a}-Verlust zu, insbesondere von reinen Adenomen zu karzinomassoziierten Adenomen. Gleichzeitig nimmt die p16^{INK4a}-Expression zu, insbesondere von Normalgewebe zu reinen Adenomen. Bei karzinomassoziierten Adenomen nimmt die p16^{INK4a}-Überexpression stark ab, erreicht dann aber bei Ex-Adenom-Karzinomen einen Wert in der selben Größenordnung (V: p16^{INK4a}-Expressionsverlust; Ü: p16^{INK4a}-Überexpression).

4.5.3 p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Überexpression bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen

Die Häufigkeiten von p16^{INK4a}-Verlust (Papillenkarcinome: 47,7 %, Dünndarmkarzinome: 24,0 %), normaler Expression (Papillenkarcinome: 43,0 %; Dünndarmkarzinome: 56,0 %) und Überexpression (Papillenkarcinome: 9,4 %, Dünndarmkarzinome: 20,0 %) waren ähnlich wie die von Cui et al. (Verlust bei 0 % Färbung, Überexpression bei mehr als 80 % Färbung) für Kolonkarzinome (CRC) ermittelten Ergebnissen mit p16^{INK4a}-Verlust in 62 %, normaler Expression in 26 % und Überexpression in 12 % der CRC (n=128). Auch beim Magenkarzinom mit häufiger Geninaktivierung durch Hypermethylierung berichten Kishimoto et al. von Verlust der p16^{INK4a}-Expression (Cutoff: 5 % p16^{INK4a}-positive Zellen) in 49 % gegenüber positiver Expression in 51 % der Fälle (n=158). In 20 % aller Fälle war eine als „relativ hoch“ bezeichnete p16^{INK4a}-Expression vorhanden (mehr als 30 % p16^{INK4a}-positive Zellen), die möglicherweise im Sinne einer Überexpression interpretiert werden kann.¹⁶⁷ Van Dekken et al. konnten bei Progress von prämaligen zu malignen Barrett-Ösophagus-Läsionen eine Zunahme der p16^{INK4a}-Expression feststellen (n=86).¹⁶⁸ Dehaan et al.¹¹⁷ berichten bei extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=24) über normale p16^{INK4a}-Expression in 27 %, uneinheitlichen p16^{INK4a}-Verlust (patchy) in 14 % und kompletten Verlust in 59 %. Die Untersuchung von Tadokoro et al.¹⁵⁷ bei Gallenblasenkarzi-

nomen (n=51) zeigte p16^{INK4a}-Verlust in 62,7 %, schwache Färbung in 17,6 %, mittlere Färbung in 17,6 und starke Färbung in 9,8 %.

4.5.4 p16^{INK4a}-Expression und histologische Subtypen

Grundlage der neuen Klassifikation von Papillenkarzinomen z.B. durch Albores-Saavedra et al. ist die Annahme der Entstehung aus unterschiedlichen Epitheltypen.^{1, 5, 6} Bei Betrachtung der p16^{INK4a}-Expressionsmuster aller histologischen Subtypen bestand zunächst kein signifikanter Zusammenhang (p=0,461; n=128). Der Vergleich von intestinalen/intestinal-muzinösen und pankreatobiliäre Papillenkarzinomen ergab nur einen tendenziellen Unterschied (=0,079; n=101), während sich intestinale/intestinal-muzinöse und G3-Adenokarzinome (p=0,040; n=55) signifikant voneinander unterschieden. Auffallend war der häufigere p16-Expressionsverlust des intestinalen (39,6 %) und intestinal-muzinösen Subtyps (27,3 %) gegenüber dem pankreatobiliären Subtyp (6,3 %). Noch viel häufigere p16-Verluste zeigten G3-Adenokarzinome (55,0 %) und invasiv-papilläre Karzinome (57,1 %). Bei Berechnung von p16^{INK4a}-Verlust gegen p16^{INK4a}-Expression bestand ein signifikanter Unterschied zwischen intestinalen/intestinal-muzinösen und pankreatobiliären Papillenkarzinomen (p=0,031; n=101) bzw. pankreatobiliären/G3-Adenokarzinomen/invasiv-papillären Karzinomen (Verlust in 6,3/55,0/57,1 %; p=0,020; n=128). Beim Vergleich der Histotypen in Bezug auf normale und gesteigerte p16^{INK4a}-Expression bestanden keine Unterschiede. Bislang sind keine weiteren Untersuchungen der p16^{INK4a}-Expression von Subtypen von Papillenkarzinomen bekannt.

4.5.5 p16^{INK4a}-Expression und Zellzyklusdysregulation

Die meisten bisherigen Publikationen zur p16^{INK4a}-Expression beschäftigen sich entweder mit p16^{INK4a}-Verlust (Magenkarzinom,¹⁶⁹ Pankreaskarzinom,¹⁷⁰ Gallenwege^{77, 78, 104, 117, 156}) oder p16^{INK4a}-Überexpression (Zervixkarzinom,^{161, 164, 171, 172} Ovarialkarzinom,¹⁷³ Barrett-Ösophagus¹⁶⁸). Neu ist hingegen der Ansatz, gleichzeitig Verlust und Überexpression zu untersuchen (Colonkarzinom,¹⁶⁶ Magenkarzinom,¹⁶⁷ Gallenwege¹¹⁵).

Eine Ursache für p16^{INK4a}-Überexpression sind Veränderungen im pRB-Regelkreis: Nach der Aktivierung durch Zyklin D1 phosphorylieren die zyklinabhängigen Kinasen CDK 4 und 6 Retinoblastomprotein (RB), das dadurch seine Konformation ändert und E2F aus seiner Bindung freigibt. E2F vermittelt über Genaktivierung ein Voranschreiten im Zellzyklus. p16^{INK4a} hingegen bremst diesen Vorgang über Inhibition von CDK 4/6. Es steht

dabei selbst in einem Regelkreis mit dem Retinoblastomprotein, das in seiner aktiven Form die p16^{INK4a}-Expression hemmt, während die phosphorylierte Form sie fördert.^{73, 173-175}

Ein sehr gutes Beispiel zur Demonstration von Störungen in diesem Regelsystem ist das (HPV-induzierte) Zervixkarzinom. In der Folge der Integration von HPV-DNA ins Zellgenom werden unkontrolliert Genprodukte exprimiert, die wie bei CDK-vermittelter Phosphorylierung zum Abbau von RB und somit über E2F zur Zellzyklusprogression führen. Gleichzeitig wird zusätzlich über Wegfall der negativen Rückkopplung von RB p16^{INK4a} induziert, was zu einer im Verlauf der Tumorprogression zunehmenden p16^{INK4a}-Expression führt^{161, 164, 171, 172}. p16^{INK4a}-Überexpression ist dabei in bis zu 100 % der Tumoren anzutreffen.¹⁶¹ Giordano et al. konnten bei Ovarialkarzinomen nachweisen, dass die p16-Überexpression auch HPV unabhängig auftreten kann.¹⁷³

Bei **kolorektalen Karzinomen (CRC)** scheint der wnt-pathway-Effektor β -catenin wesentlich an der Entstehung von p16^{INK4a}-Überexpression beteiligt zu sein. Wassermann et al. konnten nachweisen, dass die p16^{INK4a}-Transkription in CRC-Zellkulturen durch spezifische Bindung von β -catenin an das Transkriptionsfaktor 4-Bindungselement (TBE) des p16^{INK4a}-Gens gesteuert wird.¹⁷⁶ Dieses Erkenntnis passt sehr gut zur Vermutung von Brabletz et al., dass p16^{INK4a} an Vorgängen im Rahmen der sogenannten **Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT)** und **Mesenchymal-Epithelialen Transition (MET)** von kolorektalen Karzinomen beteiligt sein könnte.⁷⁰ Es handelt sich dabei um einen Vorgang, der hochdifferenzierten Adenokarzinomen die Invasion und metastatisches Wachstum ermöglicht. Voraussetzung dafür ist, dass Tumorzellen zunächst ihren epithelialen Phänotyp verlieren und einen mesenchymalen annehmen, wodurch sie die Fähigkeit erhalten, sich vom Primärtumor zu lösen, zu migrieren, Anschluss an Blut- oder Lymphgefäße zu erhalten und sich im Körper disseminieren (epithelial-mesenchymale Transition). Die Vorgänge der Entdifferenzierung an der Tumordinvasionsfront werden auch als „**budding**“ bezeichnet. In den meisten Metastasen erfolgt dann eine Redifferenzierung und die Tumorzellen nehmen wieder eine epitheliale Struktur an (mesenchymal-epitheliale Transition), bevor auch hier in Randbereichen wieder eine erneute Entdifferenzierung erfolgt.⁷⁰ Die Progression von Kolonkarzinomen muss folglich als dynamischer Prozess verstanden werden, der viele transiente Stadien von EMT und MET beinhaltet. Bei der Regulation dieser Vorgänge nehmen der wnt-pathway bzw. sein Effektor β -catenin eine Schlüsselfunktion ein, die auch in der embryologischen Entwicklung an der Steuerung von Prozessen beteiligt sind wie der Organogenese, Morphogenese, Zell-Zell-Interaktion, Migration, Proliferation, Differenzierung, EMT und Stammzellbildung. In der Tumorentstehung aktiviert β -catenin mehrere für

die Karzinomentstehung wichtige Zielgene wie z.B. Wachstumsfaktoren, EMT-Induktoren, onkogenetische Transkriptionsfaktoren, Angiogenese- und Morphogenesefaktoren sowie Faktoren, die zu Dissemination, Differenzierungsverlust und Stammzellbildung führen.^{70,}
¹⁷⁷ Eine in invasiven Bereichen durch die erhöhte β -catenin-Aktivität induzierte p16^{INK4a}-Transkription¹⁷⁶ könnte trotz gleichzeitig erhöhter Cyclin-D-1-Aktivität für die erniedrigte Proliferation in dissoziierenden CRC-Zellen verantwortlich sein.^{70, 178, 179} Zusätzlich könnte p16^{INK4a} im Zusammenspiel mit Laminin 5 γ 2 die Ursache für Migration und Invasion sein. Natarajan et al. berichten über Coexpression von laminin 5 γ 2 in p16^{INK4a}-exprimierenden mikroinvasiven Arealen von Plattenepithelkarzinomen und an künstlichen Wundrändern in Plattenepithelkarzinomen mit Migrationsbewegungen in die verletzten Bereiche.⁸⁷ Inwieweit die Erkenntnisse über Zusammenhänge von p16^{INK4a}-Expression mit β -catenin-Aktivierung und EMT auch auf Papillenkarzinome übertragbar sind, lässt sich möglicherweise aus dem Verhalten bei unterschiedlichen Stufen der p16^{INK4a}-Expression ableiten.

4.5.6 p16^{INK4a}-Expression und Überleben

Bei **Papillenkarzinomen** insgesamt und Ex-Adenom-Papillenkarzinomen war das Überleben von Patienten mit p16^{INK4a}-überexprimierenden Tumoren am schlechtesten, bei normaler Expression am besten. Patienten mit p16^{INK4a}-Verlust im Tumor hatten ein intermediäres Überleben. Dieser Zusammenhang war nicht signifikant. Bei De-novo-Papillenkarzinomen fand sich hingegen das beste Überleben bei Expressionsverlust gefolgt von normaler Expression. p16^{INK4a}-Überexpression führte erneut zum schlechtesten Überleben. Dieser Zusammenhang war hochsignifikant ($p < 0,001$). Bei Patienten mit **Dünndarmkarzinomen** war das Überleben bei p16^{INK4a}-Überexpression ebenfalls am schlechtesten. Eine eindeutige Aussage über p16^{INK4a}-Expressionsverlust war wegen der Zensurierung aller Fälle mit Expressionsverlust nicht möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchung von **kolorektalen Karzinomen** durch Cui et al. (n=128) zeigten große Übereinstimmung mit denen der Papillenkarzinome dieser Arbeit. Das Überleben war bei p16^{INK4a}-Expressionsverlust signifikant und bei p16^{INK4a}-Überexpression hochsignifikant schlechter als bei normaler (mittlerer) p16^{INK4a}-Expression.¹⁶⁶ Auch bei Wassermann et al.¹⁷⁶ (n=82) bestand ein schlechteres Überleben von Patienten mit erhöhter p16^{INK4a}-Expression, die meist in entdifferenzierten Tumorzellen an der Invasionsfront (budding) anzutreffen war, während sich in den zentralen Bereichen nur geringe oder keine

p16^{INK4a}-Expression fand. Eine Differenzierung von p16^{INK4a}-Expression und Expressionsverlust wurde nicht vorgenommen.

Ichikawa et al. definierten bei **Papillenkarzinomen** (n=25), extrahepatischen Gallengangs- (n=44) und Gallenblasenkarzinomen (n=30) verschiedene p16^{INK4a}-Expressionsmuster, die sie erhöhter und erniedrigter p16^{INK4a}-Expression zuordneten. In der Gruppe mit diffuser (erhöhter) p16^{INK4a}-Expression war das Überleben bei allen Entitäten tendenziell, bei Papillenkarzinomen signifikant besser. Wegen der unterschiedlichen Definitionen von p16^{INK4a}-Überexpression ist ein Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Hong et al.⁷⁷ konnten keinen Zusammenhang von p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Überleben bei Patienten mit extrahepatischen Gallengangskarzinomen (n=90) nachweisen. Bislang sind keine Veröffentlichungen zum Überleben in Abhängigkeit der p16^{INK4a}-Expression bei **Dünndarmkarzinomen** bekannt.

4.5.7 p16^{INK4a}-Expression und klinisch-pathologische Variablen

In mehreren Veröffentlichungen wurden bereits signifikante Zusammenhänge zwischen der p16^{INK4a}-Expression und klinisch-pathologischen Variablen berichtet. Ichikawa et al. konnten bei **Papillen-, extrahepatischen Gallengangs- und Gallenblasenkarzinomen** nachweisen, dass Tumore in der Gruppe „erniedrigte p16^{INK4a}-Expression“ signifikant häufiger infiltratives Wachstum und desmoplastisches Tumorstroma aufwiesen. Hong et al.⁷⁷ zeigten bei extrahepatischen Cholangiokarzinomen (n=90) einen Zusammenhang von p16^{INK4a}-Expressionsverlust mit Lymphknotenmetastasierung und UICC-Stadien, jedoch nicht mit Geschlecht, Wachstumsmuster, Invasion in umliegende Organe, Gefäße und Perineurium. Tadokoro et al.¹⁵⁷ hingegen fanden bei **Gallenblasenkarzinomen** keine Korrelation von p16^{INK4a}-Expressionsverlust mit Alter, Geschlecht, Tumor-Histologie, pT-Stadium oder Nodalstatus.

Die Untersuchung der p16^{INK4a}-Expression von **Papillenkarzinomen** zeigte bei höheren UICC-Stadien-Gruppierungen, höheren pT-Stadien, und im pN1-Stadium eine signifikante, bei niedrigerer Differenzierung eine tendenzielle Zunahme der p16^{INK4a}-Expression. Die prozentuale Häufigkeit von p16^{INK4a}-Verlust nahm bei zunehmendem pT- und pN-Stadium ab und bei abnehmendem Differenzierungsgrad zu. Bemerkenswert sind dabei die unterschiedlichen Größenordnungen der Veränderungen. Während sich die Überexpression ausgehend von einem sehr niedrigen Niveau aus vervielfachte, lag p16^{INK4a}-Verlust bereits bei einem bis zwei Drittel der Fälle vor und verändert sich dann nur um wenige Prozentpunkte. Dieses Verhalten bestätigt erneut die Vermutung, dass das Eintreten von p16^{INK4a}-Verlust

ein frühes Ereignis auf dem Weg zur Entstehung von Karzinomen ist (siehe Kapitel 5.1.2 und 4.5.2 p16^{INK4a}-Signalverlust/p16^{INK4a}-Expression im Verlauf der Tumorentstehung). p16^{INK4a}-Überexpression hingegen tritt im Verlauf der Fortentwicklung von Tumoren in Abhängigkeit von anderen Zellzyklus-Dysregulationen auf. Möglicherweise spielt auch hier β -catenin eine wichtige Rolle, da bei Kolonkarzinomen die Menge an nukleärem β -catenin von frühen Adenomen hin zu Adenokarzinomen ansteigt.¹⁸⁰ Zwischen p16^{INK4a}-Expression und UICC-Stadium (gruppiert) von Papillenkarzinomen (p=0,054, n=118) und Ex-Adenom-Papillenkarzinomen (p=0,002; n=62) bestand ein signifikanter Zusammenhang. pT3 und pT4 zeigten bei Papillenkarzinomen signifikant häufiger Überexpression (p=0,003; n=126) und seltener Expressionsverlust (p=0,033; n=126) als pT1 und pT2. Im Stadium pN1 war Überexpression bei Papillenkarzinomen (p=0,029) signifikant häufiger als in pN0. Zwischen Differenzierungsgrad und p16^{INK4a}-Expression bestand bei Papillenkarzinomen kein signifikanter Zusammenhang.

Bei den **Dünndarmkarzinomen** konnte kein Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und klinisch-pathologischen Variablen nachgewiesen werden. Die qualitativen Veränderungen bei Überexpression und Verlust waren denen von Papillenkarzinomen ähnlich. Verglichen mit Papillenkarzinomen trat p16^{INK4a}-Überexpression etwa doppelt so häufig, p16^{INK4a}-Verlust etwa halb so oft auf.

Wassermann et al.¹⁷⁶ (n=82) berichten bei **kolorektalen Karzinomen** keine signifikanten Zusammenhänge zwischen erhöhter p16^{INK4a}-Expression und klinisch-pathologischen Variablen. Im Stadium N1 zeigt sich häufiger hohe p16^{INK4a}-Expression als im Stadium N0. Tumoren im Stadium T2 und T3 unterschieden sich nicht wesentlich.¹⁷⁶ In der Untersuchung von Cui et al.¹⁶⁶ (n=128) führte p16^{INK4a}-Überexpression verglichen mit normaler Expression bzw. Expressionsverlust zu einer signifikant höheren Rückfall-Rate. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Kombinationen von p16^{INK4a}- und pRB-Status mit dem TNM-Stadium korrelierten.¹⁶⁶

Zusammenfassend scheint ein Zusammenhang zwischen erhöhter p16^{INK4a}-Expression und den Eigenschaften aggressiv wachsender Papillenkarzinome in hohen UICC-Stadien, pT-Stadien, pN-Status, niedriger Differenzierung und kurzem Überleben zu bestehen. Umgekehrt ist p16^{INK4a}-Signalverlust seltener in höheren pT- und pN- Stadien anzutreffen und führt bei De-novo-Papillenkarzinomen sogar zu einem hochsignifikant besseren Überleben als bei normaler und gesteigerter p16^{INK4a}-Expression. Eine mögliche Begründung für diesen „protektiven“ Effekt von p16^{INK4a}-Verlust ist, dass wie bei kolorektalen Karzinomen die Kombination von p16^{INK4a}-Erhalt in Kombination Störungen anderer Zellzyklusregula-

toren, z.B. des wnt-pathways/ β -catenin, zu einer fatalen Steigerung der invasiven Potenz führen könnte. Zur weiteren Klärung der Zusammenhänge von $p16^{\text{INK4a}}$ - und β -catenin-Aktivität und eines möglichen „protektiven“ $p16^{\text{INK4a}}$ -Verlusts sollte daher in einer weiteren Arbeit zusätzlich zur $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression eine Expressionsbestimmung von β -catenin und anderen Zellzyklusregulatoren, z.B. Bestandteilen des pRb-Pathways, durchgeführt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung über das Vorhandensein von Budding insbesondere in Fällen mit $p16^{\text{INK4a}}$ -Verlust und gesteigerter nukleärer β -catenin-Expression.

4.6 $P16^{\text{INK4A}}$ -EXPRESSIONSVERLUST UND (EPI-) GENETISCHE ALTERATIONEN

4.6.1 $p16^{\text{INK4a}}$ -Expressions- und $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust

Sowohl bei der Untersuchung von Papillen- und Dünndarmkarzinomen in dieser Arbeit als auch bei extrahepatischen Gallengangskarzinomen durch Dehaan et al.¹¹⁷ (n=28) konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust und $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression nachgewiesen werden. Allerdings bestand in 51,0 % der Papillenkzinome und 40,0 % der Dünndarmkarzinome mit $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust $p16^{\text{INK4a}}$ -Expressionsverlust sowie in 48,6 % der Papillen- und 60,0 % der Dünndarmkarzinome mit $p16^{\text{INK4a}}$ -Expressionsverlust gleichzeitig $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust. Dehaan et al. berichten über den Eindruck, dass ein Zusammenhang zwischen verminderter $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression und der Anzahl an Zellen mit $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust bestand. Die Untersuchung oraler Plattenepithelkarzinome durch Uzawa et al.¹⁴⁵ (n=57) ergab hingegen einen kompletten Verlust der $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression in 8 von 10 Fällen und verminderte Expression in den restlichen Fällen mit $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust.

Eine mögliche Ursache für die im Vergleich zu Ösophaguskarzinomen schlechtere Übereinstimmung von $p16^{\text{INK4a}}$ -Signalverlust und $p16^{\text{INK4a}}$ -Expressionsverlust könnte sein, dass als Second hit bei Papillen- und vor allem Dünndarmkarzinomen häufige Promotormethylierungen auftreten.

4.6.2 p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Mikrosatellitenalterationen

Bei der LOH-Analyse mit Silbergelten können nur hemizygoten Deletionen (Verlust eines der beiden Allele) erfasst werden, während p16^{INK4a}-Expressionsverlust nur Inaktivierung beider Allele erfasst. Eine Übereinstimmung beider Methoden kann folglich nur in Fällen bestehen, bei denen nur eines der beiden Allele durch Deletion inaktiviert wurde. Bei De-novo-Papillenkarzinomen bestand in allen Fällen mit LOH in mindestens einem der Marker ein gleichzeitiger p16^{INK4a}-Signalverlust ($p=0,010$; $n=54$), bei Ex-Adenom-Papillenkarzinomen hingegen nur in 30 % der Fälle. Es bestand keine signifikante Assoziation von LOH in mindestens einem Marker und p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Bei den Dünndarmkarzinomen war in 40,0 % der Fälle mit LOH in mindestens einem der Marker ein gleichzeitiger p16^{INK4a}-Signalverlust vorhanden, der Zusammenhang war ebenfalls nicht signifikant. Tadokoro et al.¹⁵⁷ fanden bei Gallenblasenkarzinomen ($n=51$) für LOH in mindestens einem der 5 verwendeten Mikrosatellitenmarker ebenfalls keinen Zusammenhang mit p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Im Falle von LOH bei drei innerhalb der p16^{INK4a}-Sequenz gelegenen MS-Marker bestand hingegen ein signifikanter Zusammenhang. Für extrahepatische Gallengangskarzinome beschrieben Caca et al.⁷⁸ in 90,9 % der Fälle mit p16-Expressionsverlust ($n=11$) gleichzeitig Mikrosatellitenalterationen. Tannapfel et al.¹⁵⁶ ermittelten bei intrahepatischen Cholangiokarzinomen für zwei Karzinome mit homozygoter Deletion (9 MS-Marker) einen p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Dabei wurde homozygote Deletion in der Fluoreszenz-MSI-Analyse bei 10mal schwächerer Intensität eines Allels verglichen mit dem Allel in Normalgewebe definiert.

4.6.3 p16^{INK4a}-Expressionsverlust und Methylierung

Methylierung ging häufig mit Verlust der p16^{INK4a}-Expression einher. Bei allen Papillenkarzinomen ($p=0,038$) und Ex-Adenom-Papillenkarzinomen ($p=0,004$) bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und Methylierungsstatus, während bei De-novo-Papillenkarzinomen ($p=1,000$; $n=4$) und Dünndarmkarzinomen bei sehr geringen Fallzahlen ($p=1,000$; $n=5$) kein signifikanter Zusammenhang bestand. Bei Ex-Adenom-Papillenkarzinomen war in keinem Fall der leicht, halb und vollständig methylierten Karzinome p16^{INK4a}-Expression vorhanden. Bei Dünndarmkarzinomen zeigten leicht, halb und vollständig methylierte Tumoren in 50 % der Fälle gleichzeitigen p16^{INK4a}-Verlust.

Bisher gibt es keine weiteren Veröffentlichungen über p16^{INK4a}-Expression und Methylierung bei Papillenkarzinomen. Bei extrahepatischen Gallengangskarzinomen (Hong et al. ⁷⁷; n=90) wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hypermethylierung und Expressionsverlust berichtet. Auch bei intrahepatischen Cholangiokarzinomen bestand in 100 % der Fälle (n=39) mit Hypermethylierung ein kompletter Verlust der p16^{INK4a}-Expression. Umgekehrt war in allen Fällen ohne Methylierung (n=10) die p16^{INK4a}-Expression erhalten (Tannapfel et al. ¹⁵⁶; n=151) Bei Gallenblasenkarzinomen hingegen bestand in der Untersuchung von Tadokoro et al. ¹⁵⁷ kein signifikanter Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Hypermethylierung und p16^{INK4a}-Expressionsverlust. Von 37 Tumoren mit Hypermethylierung zeigten 51,1 % p16^{INK4a}-Expressionsverlust.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde anhand der weltweit größten Serie von Papillenkarzinomen mit bekanntem klinischen Verlauf die Bedeutung des p16^{INK4a}-Tumorsuppressorgens in der Karzinogenese von Papillen- und Dünndarmkarzinomen untersucht. Neben einer erstmals an TMA-Schnitten von Papillen- und Dünndarmgewebe durchgeführten UroVysion[®]-Färbung von TMA-Schnitten und einer MSI-Analysen zur Erfassung genetischer 9p-Alterationen wurde eine Methylierungsanalyse zur Erfassung epigentischer p16^{INK4a}-Inaktivierungen durchgeführt. Weiterhin wurde die immunhistochemische p16^{INK4a}-Expression untersucht.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unter Verwendung von Tissue-Mikro-Arrays erwies sich dabei als effiziente und gut geeignete Methode. Unter Berücksichtigung der Beziehungen der einzelnen Gewebeentitäten von Papillen- und Dünndarmkarzinomen untereinander konnte ein Tumormodell demonstriert werden, bei dem p16^{INK4a}-Signalverlust in Normalgewebe oder vorbestehenden Adenomen den entscheidenden Unterschied zwischen De-novo- und Ex-Adenom-Karzinogenese ausmacht.

Die Untersuchung der p16^{INK4a}- Expression erfolgte erstmals unter Berücksichtigung von p16^{INK4a}- Expressionsverlust bei weniger als einem Prozent p16^{INK4a}-positiver Zellen und Überexpression bei mehr als 70 % p16^{INK4a}-positiver Zellen innerhalb einer Tumorstanze.

Im Verlauf der Tumorprogression entsprach die Häufigkeit von p16^{INK4a}-Expressionsverlust den Ergebnissen von p16^{INK4a}-Signalverlust in der FISH. Besonders interessant war jedoch das Verhalten von p16^{INK4a}-Überexpression, das im Verlauf der Tumorprogression eine im Vergleich zu Normalgewebe signifikant gesteigerte p16^{INK4a}-Expression bei Adenomen und Karzinomen zeigte, sowie eine z.T. hochsignifikante Zunahme der p16^{INK4a}-Überexpression bei höherem UICC-Stadiengruppierungen pT- und pN-Stadien von Papillenkarzinomen. Bei Dünndarmkarzinomen bestanden tendenziell die selben Zusammenhänge. Auch beim Überleben zeigte sich, dass p16^{INK4a}-Überexpression mit aggressiverem Tumorwachstum einherzugehen schien, da das Überleben bei Papillen- und Dünndarmkarzinomen in der Gruppe mit Überexpression schlechter war als bei normaler oder fehlender Expression. Möglicherweise könnte sich p16^{INK4a}-Verlust sogar positiv auswirken, da bei De-novo-Papillenkarzinomen das Überleben mit p16^{INK4a}-Verlust hochsignifikant besser war als bei normaler Expression und Überexpression. Wesentlich für die Auswirkung des jeweiligen p16^{INK4a}-Status scheinen zusätzliche Zellzyklusdysregulationen wie die des wnt pathways zu sein, da bei Expressionsverlust, epigenetischen und genetischen 9p-Alterationen keine Korrelation mit klinisch-pathologischen Variablen wie Differenzierungsgrad, pT-Status, pN-Status, UICC-Stadien oder dem Überleben von Papillen- und Dünndarmkarzinom-Patienten bestehen.

Die Muster (epi-)genetischer p16^{INK4a}-Alterationen zeigten deutliche Unterschiede zwischen Papillen- und Dünndarmkarzinomen. Bei Papillenkarzinomen war p16^{INK4a}-Expressionsverlust signifikant häufiger. Sie zeigten in der FISH tendenziell und in der MSI-Analyse signifikant häufiger genetische 9p-Alterationen. Dünndarmkarzinome hingegen wiesen signifikant häufigere p16^{INK4a} Methylierung auf. p16^{INK4a}-Überexpression war bei ihnen tendenziell häufiger, was möglicherweise auf die geringere Häufigkeit von p16^{INK4a}-Alterationen zurückzuführen sein könnte, die sich auch in einer geringeren Häufigkeit von p16^{INK4a}-Expressionsverlust ausdrückte. Durch signifikante Unterschiede von intestinalen- und intestinal-muzinösen Karzinomen gegenüber pankreatobiliären bzw. G3-Adenokarzinomen bezüglich ihrer p16^{INK4a}-Expressionsmuster und der Häufigkeit von Mikrosatellitenalterationen konnte die Hypothese der Entstehung von Papillenkarzinomen aus zwei unterschiedlichen Epitheltypen untermauert werden.

6 ANHANG

6.1 MATERIAL

6.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Aristoplan Fluoreszenzmikroskops (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar)
Bond®-System-Färbegerät, Menarini Diagnostics, Florenz, Italien
Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg)
Concentrator 5301 (Eppendorf, Deutschland)
Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL, (Pharmacia, GE Health-Care, Piscataway, USA)
Filter für Aristoplan-Fluoreszenzmikroskop (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar)
Gel-Fix PAG-Folie (Serva, Heidelberg)
Geltrockner Modell 583 (Bio-Rad, München)
IKA-Minishaker MS 2 (IKA-Werke GmbH, Staufen)
Knick pH-Einstabmesskette SE100 mit dem pH-Meter 765 Calimatic (Knick Elektrische Messgeräte, Berlin)
Lichtmikroskop HM-Lux 3 (Leitz, Wetzlar)
Magnetrührer mit Heizplatte MR 2002 (Heidolph, Nürnberg)
Mikrowelle Whirlpool Jet 900 W M600 (Philipps, Niederlande)
Minishaker MS2 (IKA, Staufen)
MTA-1 Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, USA)
Multiphor II und Multitemp III (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
Pipetten Pipetman (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
Pipettenspitzen mit Sterilfilter (Biozym, Oldenburg)
Puffer AL (Quiagen, Hilden)
Puffer AW (Quiagen, Hilden)
Pipettenspitzen Typ B, D, E (Sarstedt, Nümbrecht)
Reaktionsgefäße Genetic Analyzer 0,5 ml (PE Applied Biosystem, USA)
Reaktionsgefäße Safe Lock 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße Safe Lock 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg)
Schüttler VF 2 (Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
Spannungsgerät Microcomputer Electrophoresis Consort E 455 (Bio-Rad, München)
Spannungsgerät Power Pac 3000 Power Supply (Bio-Rad, München)
Sterile Nadeln Microlance 3 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY)
Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown MA, USA)
Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-100 MJ Research (Watertown, MS, USA)

Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research (Watertown, MS, USA)
Vacuumzentrifuge Speed Vac [®] SC 100 (Savant-Instruments, Farmingdale, USA)
Variomag Elektrorührer Mono (H+P Labortechnik GmbH, München)
Waage Analytic A 200 S (Sartorius, Göttingen)
Waage Laboratory L 310 (Sartorius, Göttingen)
Wasserfilteranlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn)
Whatman Chromatographiepapier (Merck, Darmstadt)
Zentrifuge Biofuge A Sepatech (Heraeus, Osterode)
Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus, Osterode)

6.1.2 Reagenzien

Sämtliche verwendeten Chemikalien weisen Analysequalität auf. Nicht eigens aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 (40 %) (Bio-Rad, München)
ABC-Elite-Vectorstain-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Ameisensäure 99 %, (Merck, Darmstadt)
Ammoniumpersulfat 98 % (Sigma, München) Borsäure (Bio-Rad, München)
Bromphenolblau (SIGMA, München)
Bromphenolblau Na-Salz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Buffer 10x Rx PCR (GIBCO BRL, Eggenstein)
CpGenome DNA Modification Kit (Qbiogene Inc., Irvine CA, USA)
Desoxyribonukleotidtriphosphate (Boehringer, Mannheim)
Dextranblau (Fluka, Buchs, Schweiz)
Diamino-Phenyl-Indol (DAPI) (Merck, Darmstadt)
DMSO (Dimethylsulfoxid) (Merck, Darmstadt)
DNA Längenstandards VIII (Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
DNA Polymerisations Mix (Nucleotide) (Amersham Biosciences, Piscataway NJ, USA)

DNA-Molekulargewichtsstandard λ -DNA/Hind-III-Fragmente (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA)
DNA-Molekulargewichtsstandard 1 kb DNA-Ladder (GIBCO BRL, Eggenstein)
EDTA (Serva, Heidelberg)
EDTA-Lösung 0,5 M (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Entellan (Merck, Darmstadt)
Eosin 0,5 % (Merck, Darmstadt)
Essigsäure (100%) (Merck, Darmstadt)
Essigsäure 96 % (Merck Darmstadt)
Ethanol 99,8% (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Ethanol Rotipuran 99,8 % p.a. (Roth, Karlsruhe)
Formalinlösung 37 % (Merck Darmstadt)
Formamid (SIGMA, München)
Formamid Ultra Plus (GIBCO BRL, Eggenstein)
Gene Quant II Spektralphotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
Glycerol 99,5 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)
Harnstoff (Bio-Rad, München)
Isopropanol p.a. (Merck, Darmstadt)
Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
Mercaptoethanol (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
Methylenblau (SIGMA, München)
Methylierte Standard DNA (Qbiogene., Irvine, USA)
MgCl ₂ (GIBCO BRL, Eggenstein)
Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat 99%, (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Natriumhydroxid 99%, (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
New-Fuchsine-red 5% (Merck, Darmstadt)
Normal swine serum (Vector Laboratories Burlingame, USA)
PBS (phosphate-buffered Saline, pH 7.4) (Merck, Darmstadt)
PCR-Puffer (GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, USA)

Phenol (TE-gesättigt) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Piperazine Diacrylamide (PDA) (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)
Polyacrylamid (PAA) (ROTH, Karlsruhe)
Polyethylenglykol 8000 (Aldrich, Steinheim)
Primer (TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin)
Primer (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin, Deutschland)
QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)
Safe Lock Tube (Eppendorf, Deutschland)
Salpetersäure (Merck, Darmstadt)
Sample Application Pieces und die Elektrophoresefolie GEL-FIX PAG (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
Sigmacote (SIGMA, München)
Silbernitrat (Carl Roth, Karlsruhe)
TEMED (Merck, Darmstadt)
TEMED (Rotiphorese Gel A (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Tris-Puffer (Bio-Rad, München)
UroVysion® Bladder Cancer Kit (UroVysion Kit®) (Abbot, Les Plaines, USA)
Xylen Cyanol FF (SIGMA, München)
Xylol (Merck, Darmstadt)
Zitratpuffer, 10 mmol/L, pH 6.0 (Merck, Darmstadt)

6.1.3 Enzyme

AmpliTaq [®] DNA Polymerase (UPE-Applied Biosystems, Foster City, USA)
Hot Goldstar Kit mit DNA Polymerase (5U/μl), MgCL ₂ (25mM), 10fach Pufferlösung (Eurogentec Seraing, Belgien)
Proteinase (Merck, Darmstadt)
Taq-DNA-Polymerase (GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, USA)

6.1.4 Primer

6.1.4.1 MSI-Analyse

D9S1747	Pky 2	Sequenz 5'	9p 21	S:GGCTTTCTCTCTTTTTGTCTC
D9S1748	Pky 3	Sequenz 5'	9p 21	S:CACCTCAGAAGTCAGTGAGT
D9S1751	Pky 11	Sequenz 5'	9p 21	S:TTGTTGATTCTGCCTTCAAAGTCTT TTAAC
D9S304		Sequenz 5'	9p 13.3	S:GTGCACCTCTACACCCAGAC

Proligo, Boulder, USA

6.1.4.2 Methylierung

MLH1 F	unmethyliert	vorwärts	Sequenz 5'	-gAAgAgTggATAgTgATTTTAAATgT
MLH1 R	unmethyliert	rückwärts	Sequenz 5'	- ATCTCTTCATCCCTCCCTAAAACA
MLH1mR	Methyliert	Vorwärts	Sequenz 5'	- gAAgAgTggATAgTgATTTTAAATgT
MLH1mR	Methyliert	Rückwärts	Sequenz 5'	TCTTCgTCCCTCCCTAAAACg

M: methyliert, U: unmethyliert, V: vorwärts, R: Rückwärts

TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin.

6.1.5 Antikörper

Clone E6h4 MTM Laboratories AG, Heidelberg
--

6.1.6 Lösungen

Zur Herstellung der aufgeführten Puffer und Lösungen wurde stets ultrafiltriertes Wasser aus einer Wasserfiltrationsanlage (MILLIPORE, Eschborn) verwendet.

6.1.6.1 Allgemeine Lösungen

0,5 M EDTA (pH 8,0):	
Ethylendiamintetraacetat	73,1 g
Aqua dest.	800 ml
Rühren, mit NaOH pH 8,0 einstellen, mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen	

Lösung zur Methylenblau-Färbung	
Stammlösung	
Methylenblau-Lösung (1 %)	
Trihydratpulver	1 g
Aqua dest.	100 ml
Arbeitslösung 0,1 %	

6.1.6.2 HE-Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin (0,5 %) von Merck (Darmstadt):	
Monohydratpulver	0,5 g
Ethanol	10,0 ml
→ Lösen	
Aqua dest.	90,0 ml
→ Verdünnen, Reifezeit 5 Wochen	

6.1.6.3 DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

Ethanol 70%	
Ethanol abs	700,0 ml
Aqua dest.	300,0 ml

Digestion-Buffer	
Tris (pH 8,5)	250,0 µl
EDTA (pH 8,0)	250,0 µl
Tween 20 (0,5 %)	100,0 µl
Aqua dest.	ad 50 ml
→ Aliquotieren, autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur	

6.1.6.4 Amplifikation genomischer DNA durch PCR

Taq-DNA-Polymerase (gebrauchsfertig von GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, USA)	
Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
EDTA	0,1 mM
DDT	1 Mm
Glycerin	50 % (v/w)
Stabilisatoren	
Taq-Polymerase	

10 X PCR-Puffer gebrauchsfertig von (GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, USA)	
Tris-HCl (pH 8,4)	200 mM
KCl	500 mM

dNTP-Mix Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	
Stammlösung: je dNTP	100 mM
Arbeitslösung dNTP-Mix	10 mM
je dNTP	10 µl
H ₂ O	ad 100 µl
steril auf Eis aliquotieren, Lagerung bei –20 °C	
Oligonukleotid-Primer	
Stammlösung: je forward (f) und reverse (r) Primer	100 µM
Arbeitslösung: Primer-Mix	15 µM
f- und r-Primer	je 30 µl
H ₂ O	ad 200 µl

6.1.6.5 PAA-Gelelektrophorese

TBE (10x)	
Tris	108,0 g
Borsäure	55,0 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40,0 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
→ filtrieren, Lagerung bei Raumtemperatur	

PAA-Harnstofflösung (6,7 %)	
Urea	453,6 g
TBE 10x	108 ml
PAA	180 ml
Aqua dest.	432 ml
→ unterm Abzug mischen, filtrieren, Lagerung bei 4°C	

Ammoniumpersulfat (10 %)	
APS	10 g
Aqua dest.	100 ml
→ Aliquotieren, Lagerung bei -20°C	

Ladepuffer	
Formamid	10,0 ml
Xylen Cyanol FF	10,0 mg
Bromphenolblau	10,0 mg
0,5 M EDTA (pH 8,0)	200,0 µl
→ Aliquotieren, Lagerung bei -20°C	

Marker	
1 kb DNA-Ladder (1 µg/µl)	4 µl
Loading Buffer	16 µl

PAA-Gel-Mix	
PAA-Mix (6,7%)	80 ml
APS (10%)	100 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	10 µl

6.1.6.6 Silberfärbung (MSI-Analyse)

Ethanol (10 %):	
Ethanol absolut	100,0 ml
Aqua dest.	900,0 ml

Salpetersäure (1 %):	
Salpetersäure (65 %)	15,0 ml
Aqua dest.	985,0 ml

Silbernitratlösung (0,012 M)	
Silbernitrat	2,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
→ Lagerung in lichtgeschützten Behältern	

Natriumcarbonat (0,28 M) / Formalin (0,019 %)	
Natriumcarbonat	29,7 g
Formaldehyd (37 %)	520 µl
Aqua dest.	ad 1000 ml

Essigsäure (10 %)	
Eisessig	100,0 ml
Aqua dest.	900,0 ml

6.1.6.7 Bisulfidbehandlung

3M Natriumhydroxidlösung	
NaOH	0,5 g
Aqua dest	4,15 ml

Modifikationslösung I	
Reagenz I (DNA-Modification Kit)	227 mg x Anzahl der Proben
Aqua dest.	4,15 ml x Anzahl der Proben
3M NaOH	auf pH 5,0 einstellen

20mM NaOH/90% Ethanol	
Ethanol abs.	900 µl
Aqua dest.	93,4 µl
3M NaOH	6,6 µl

Mercaptoethanol-Aqua.dest-Lösung	
Aqua dest.	20 ml
Mercaptoethanol	1 µl

Modifikationslösung II	
Mercaptoethanol-Aqua-dest-Lösung	750 µl
Reagenz II	1,35 g
So lange schütteln bis Lösung klar	

6.1.6.8 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Acryl-PDA 14%	
Rotiphorese gel Acrylamidlösung 30%	500 ml
PDA	7,45 g
Aqua dest.	564 ml

Tris-Puffer 120mM	
TRIS-base	90,75 g
Ameisensäure 99%	4,47 ml
Aqua dest.	1000 ml

APS 10%	
Ammoniumperoxodisulfat	10 g
Aqua dest.	100 ml

TBE-Laufpuffer	
TRIS-base	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA 0,5M	20 ml
Bromphenolblau	100 µl
Aqua dest.	1000 ml

VWA Elektrophoresegel 9%	
Acryl-PDA 14%	25,6 ml
TRIS-Puffer	14,4 ml
APS 10%	400 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	40 µl

6.1.6.9 Silberfärbung (Methylierungsanalyse)

Salpetersäure 3%	
Salpetersäure 65%	60 ml
Aqua dest.	1240 ml

Silbernitrat 0,2%	
Silbernitrat	0,4 g
Aqua dest.	200 ml

Natrium-Carbonat-Formalin-Lösung	
Formalin	0,5 ml
Natriumcarbonat	15 g
Aqua dest.	1000 ml

Essigsäure 10%	
Essigsäure 96%	200 ml
Aqua dest.	1800 ml

Glycerollösung 5%	
Glycerol	25 ml
Aqua dest.	475 ml

6.1.6.10 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Natrium-Zitrat-Lösung 0,01M	
Na-Zitrat	0,49 g
Aqua dest.	500 ml
Auf pH 6,0 einstellen mit HCl 32%	

HCl 0,01M	
HCl 2M	250 µl
Aqua dest.	50 ml

Pepsin 0,1 %	
Pepsin	50 mg
HCl 0,01M	50 ml

Carnoy	
Methanol	3 Teile
Eisessig	1 Teil

20x SSC (Saline Sodium Citrate Buffer)	
NaCl	175,32 g
Natriumzitat	88,24 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
Auf pH 5,3 einstellen mit HCl 32 %	

2x SSC (Saline Sodium Citrate Buffer)	
20x SSC pH 5,3	100 ml
Aqua dest.	900 ml
Auf pH 7,0 – 7,5 einstellen mit HCl 32 %	

4x SSC (Saline Sodium Citrate Buffer)	
20x SSC pH 5,3	200 ml
Aqua dest.	800 ml
Auf pH 7,0 – 7,5 einstellen mit HCl 32 %	

Ethanol 70 %	
Ethanol abs.	70 ml
Aqua dest.	30 ml

Ethanol 85 %	
Ethanol abs.	85 ml
Aqua dest.	15 ml

6.2 ROHDATENTABELLEN

6.2.1 klinisch-pathologische Variablen

	Ca											ca-ass-Ad	r-Ad
Nummer	Überleben (Mon)	Vitalität	Alter b. Diagnose	Entität	Subtyp	Größe (cm)	Grade	Stage	pT	pN	pM	Größe (cm)	Größe (cm)
1	20	0	77	1	1	1,7	2	2	1	0			
2	18	1	70	2	1	4	2	6	3	1			
3	11	1	68	1	3	1,5	2	6	3	1			
4			80	3									k. A.
5			62	2	1	0,3	1		1			1	
6	34		62	3									1,5
7			59	3									1,5
8	8	1	69	1	1	2	3	6	3	1			
9	14	1	67	2	1	1,5	3	6	3	1			
10	34		65	2	1	2	2	8	2	0	1		
11	78	0	76	2	1	0,1	1		1			1,5	
12	7	1	76	2	4	1,5	3	6	3	1			
13	26	1	73	1	1	2	2	6	3	1			
14	57	0	77	2	1	0,2	1	2	1	0		1	
15	57	0	80	3									3
16	57	0	70	2	1	1,5	3	3	2	0			
17	16	1	56	1	1	1,5	2	6	3	1			
18	28	1	63	2	4	1,5	2	6	2	1			
19	58	0	74	2	1	2	2	6	3	1			
20	58	0	55	2	2	6	2	6	2	1			
21	40	0	67	3									0,6
22			54	2	1	8	1	2	1	0			
23	59	0	65	1	1	1,1	2	3	2	0			
24	60	0	73	2	2	1,5	2	3	2	0			
25	42	1	67	2	2	1,5	3	2	1	0			
26	61	0	73	2	1	2,5	2	3	2	0			
27	0		68	2	1	1,5	2	6	3	1			
28	6	1	75	1	1	2,6							
29	63	0	79	2	1	0,5	2	2	1	0		3	
30	31		71	3									0,7
31	43	0	69	2	2	3,3	3	5	3	0			
32	44	0	75	2	1	1,2	3	6	2	1			
33	46	0	77	1	3	1,8	2	3	2	0			
34	16	1	78	2	1	6	2	6	3	1			
35	41	1	74	2	2	6	2	6	3	1			
36	7	1	67	2	5	3	3	7	4	1			
37	65	0	63	2	1	5	3	5	3	0			
38	54	0	67	2	4	1,4	3	5	3	0			
39	47	1	67	1	4	1,5	2	6	3	1			
40	78	0	76	2	1	3	2	6	3	1			
41	0		67	2	3	0,9	1	5	3	0			
42	80	0	65	2	1	1,5	2	6	3	1			

43	82	0	68	2	1	2	1	3	2	0			
44	20	1	61	2	5	2,5	2	6	2	1			
45	0		68	3									0,9
46	50		68	2	1	1,5	2	6	3	1			
47	83		65	2	1	2,5	1		1				
48	14	1	64	1	4	2,2	2	5	3	0			
49	73	0	70	1	3	3	1	6	2	1			
50	86		53	3									2,6
51	9	1	60	1	3	1,2	1	3	2	0			
52	92	0	66	1	1	2	2	3	2	0			
53	7		54	1	4	2	2	3	2	0			
54	16	1	73	1	1	1,5	2	6	3	1			
55	95	0	76	2	1	3,5	2	5	3	0			
56	96	0	77	2	3	2,3	1	3	2	0			
57	32	1	73	1	3	2	2	7	4	1			
58	32	1	55	1	4	1,8	2	6	2	1			
59			71	1	5	1	2	6	3	1			
60	102	0	75	3									4
61	44	1	67	2	1	1,5	1	6	3	1			
62	102	0	56	3									1
63	104	0	77	1	3	1,5	2	3	2	0			
64	15	1	70	1	4	1,5	3	6	3	1			
65	29	1	52	1	3	2	2	6	3	1			
66	107	0	50	1	3	1,5	2	6	2	1			
67	16	1	66	1	3	2	2	3	2	0			
68	0	1	76	1	4	1	3	6	2	1			
69	27	1	57	1	3	1,5	2	6	3	1			
70	14	1	68	2	2	2,5	3	8	2		1		
71	112	0	64	1	1	1,3	2	6	2	1			
72	11		75	2	4	2,2	2	2	1	0			
73	106	0	62	2	1	1,2	2	6	3	1			
74	17		48	2	1	1,2	1	2	1	0			
75	29	1	68	1	5	1	1	3	2	0			
76	99	0	63	2	1	3	2	3	2	0			
77	127	0	43	3									3,8
78	118	0	56	2	1	4	1	3	2	0			
79	23		67	2	5	5	3	6	3	1			
80	13	1	54	1	3	1,5	3	5	3	0			
81	14	1	49	2	2	2	3	8	4	1	1		
82	11		57	2	1	3,5	2	6	2	1			
83	9	1	68	1	1	1,4	3	6	3	1			
84	0		54	2	3	3,2	2	5	3	0			
85	30	1	79	2	1	2	2	6	3	1			
86	16	0	69	3									4
87	0		47	4	1	3	3	7	3	1			
88	24	0	52	4	1	4,5	2	4	4	0			
89	20	1	61	4	1	6,5	2	7	4	1			
90	22	0	77	5									
91	12	1	77	3									0,5
92	26	0	75	6									3
93	28	0	51	5	1	1,4	2		3		1		
94	19	0	80	6									0,6

95	133	0	60	5	2	1,5	2	4	3	0			
96			37	3									1
97	21		72	2	1	3	3	2	1	0			
98	40	0	63	3									3
99	21	1	48	2	3	1,5	2	3	2	0			
100	101	0	79	5	1	3,5	2	1	2	0			
101	39	0	42	6									1,5
102	5	1	56	1	4	2	3	6	3	1			
103	85	0	69	2	1	3	2	3	2	0			
104	15	1	80	5	2	?	2	7	4	1			
106	11		65	4	1			8			1		
107			74	5	1	4,5	2	8	3	1	1		
108			68	5	1	6,5							
109			59	5	1	3,2	2		4				
110	112	0	62	3									1
111			75	2	3	2	3	5	3	0			
112	66	1	67	4	2	5	3	7	3	1			
113	70		65	3									0,6
114			82	3									1,2
115			65	3									2,3
117			76	2	3	1,1	2	6	2	1			
118	85		69	4	1	5,5	3	4	3	0			
119			56	3									1,5
120	96	0	72	6									2,5
121			80	6									1,9
122			69	5	2	8	3	4	4	0			
123			78	2	1	7	3	5	3	0			
125			54	2	1	1,5	1	2	1	0			
127	34	1	78	1	3	1,5	1		2				
128	46	0	57	6									4
129	27		83	5	1	2	3	4	3	0			
130	48	0	62	2	1	4,2	3	6	2	1			
131	11	1	59	4	1	2,8	2	4	4	0			
132	32	0	51	6									0,9
133	0		78	2	1	1,5	1	2	1	0			
141	0		59	6									1
143	56	0	70	2	2	2,5	3	5	3	0			
145			52	4	1	7	2	4	3	0			
146			72	1	1	1,5	2	5	3	0			
147			68	4	4	7	3	4	3	0			
148			59	1	3	1	3	6	2	1			
149			57	2	1	3,5	2	3	2	0			
150			73	1	1	2	2	2	1	0			
151			72	5	1	4,5	3	7	4	1			
152			71	1	1	1,6	2	3	2	0			
153	38	0	63	2	1	1,5	1	2	1	0			
154	43	0	58	2	1	5	2	6	3	1			
155	43	0	63	1	1	1,5	2	6	2	1			
156	21	1	75	1	3	1,5	3	5	3	0			
157	36	0	79	1	1	2	3	6	3	1			
158	7	1	46	1	3	3,5	3	7	4	0			
160	28	0	47	1	4	1,5	3	3	2	0			

161	20	1	45	2	1	2	2	2	1	0			
162	16	1	71	2	1	6	2	6	3	1			
163	27	0	61	2	1	1	2	2	1	0			
164			74	2	4	5	3	6	3	1			
165			72	2	1	2	2		2				
166			69	2	3	0,5	2	2	1	0			
167			47	2	1	1,5	1	2	1	0			
168			64	3									1,3
169			52	2	4	2		6	3	1			
171			61	2	1	1,5	2	3	2	0			
172			43	1	1	2,2		6	3	1			
173			66	1	4	1,5	3						
174	15	1	60	1	3	1,5	3	6	3	1			
175	2		80	1	3	2							
176	87	1	46	1	3	1	1	2	1	0			
177	9	1	81	1	3	2	2		2				
178	100	0	59	2	2	6	3	3	2	0			
179	97	0	54	1	1	0,4	2	2	1	0			
180	21	0	62	2	2	9	3	7	4	1			
181	30	1	71	1	1	2	2	5	3	0			
183	22	0	61	1	2	3	2	6	3	1			
184			73	3									k. A.
185			63	3									k. A.
186			75	3									k. A.
187			66	6									k. A.
188			79	3									k. A.
189			84	3									k. A.
190			69	3									k. A.
191	5	0	65	6									k. A.
192	67	0	40	4	4	8	3	4	4	0			
193			77	4	4	10	3	7	4	1			
194	32	0	59	4	1	4	2		3				
195	2	1	67	4	1	8	3	7	4	1			
196	25	0	42	4	1	5	2	4	3	0			
197	83	0	57	5	1	5	2	7	2	1			7
198	73	0	86	6									2,9
199	36	0	54	6									2
200	9	0	43	5	1	3,5	2	8	3	1	1		
201	32	0	36	3									1
202	80	0	55	5	1			7					4,5
203	95		45	6									1,2
205	76	1	56	4	1	3,5	2		3		1		
206	19	0	53	1	3	1,7	3	6	3	1			
207			56	1	1	1	2	3	2	0			
208			77	1	2	2,3	3	5	3	0			
209			60	1	3	3	2	7	4	1			
210			40	4	1	4	2	1	2	0			
211			74	4	2	6	2	1	2	0			
212			74	4	1	5	2	7	3	1			
213			55	2	1	1,5	2	6	1	1			
214		1	79	2	4	4,5	2	5	3	0			
215			67	1	3	2,5	1	6	1	1			

216			55	1	1	3	2	3	2	0			
217			44	2	3	1,5	2	6	3	1			
218			73	2	4	2	2	7	4	1			
219			74	1	3	2,4	3	6	3	1			
220	?		68	1	3	2	3	3	2	0			
221	3		55	1	3	1,3 ?	2	3	2	0			
222	18		82	3									1,5
223	10	0	63	6									1
227	14	0	82	2	1	1,5	1		1				
228	14	0	82	2	1	2,6	2	6	2	1			
229	11	0	59	2	3	1	2	6	2	1			
230	10	0	69	1	1	1,3	3	3	2	0			
231	11	0	72	3									1,2
232	21	0	57	3									3,5
234	0	1	44	1	3		3	6	3	1			
235	17	1	71	7	3		2	6	2	1			
236	0	1	57	1	3		3	7	4	1			
237	70	1	51	7	3		3	6	2	1			
238	1	1	61	7	3		3	3	2	0			
239	5	1	60	7	3		2	6	2	1			
240	2	1	66	7	3		3	3	2	0			
241	4	1	49	7	3		3	3	2	0			
242	22	1	60	7	3		2	6	3	1			
243	7	1	71	7	3		3	5	3	0			
244	6	1	61	7	3		2	6	3	1			
245	14	1	70	7	3		3	5	3	0			
246	26	1	74	7	3		2	6	3	1			
247	27	1	71	7	3		3	5	3	0			
248	15	1	67	7	3		2	3	2	0			
249	68	0	58	7	3		3	6	3	1			
250	1	1	79	2	3		2	5	3	0			
251	0	1	57	1	4		3	7	4	1			
253	164	0	67	2	1		1	2	1	0			
254	56	1	79	1	1		2	3	2	0			
255	14	1	66	1	4		3	3	2	0			
257	1	1	57	1	3		3	6	2	1			
258	38	1	78	1	1		3	3	2	0			
259	1	1	61	2	1		2	3	2	0			
260	0	1	74	2	4		3	3	2	0			
261	27	1	53	1	4		3	6	2	1			
262	128	0	52	1	5		3	2	1	0			
264	114	0	73	2	5		2	3	2	0			
266	92	0	65	2	3		3		2				
267	46	1	72	2	1		2	5	3	0			
268	12	1	65	1	1		3	6	3	1			
269	28	1	75	2	1		3		1				
270	79	1	65	2	5		2	2	1	0			
271	23	1	50	1	5		2	6	2	1			
272	1	1	77	2	1		3		3				
273	1	1	65	2	4		3	6	3	1			
274	71	0	51	1	2		3	6	2	1			
275	20	1	67	1	3		3	7	4	1			

276	8	1	69	1	1		3	7	4	1			
277	15	1	64	1	1		2	3	2	0			
278	14	1	67	2	1		3	6	3	1			
279	56	0	68	2	2		3		2				
280	42	0	63	1	1		3	3	2	0			

Subtyp: 0 =kein Karzinom, 1 =intestinal, 2 =intestinal-muzinös, 3 =pankreatobil , 4 =G3-Adenokarzinom, 5 =invasiv-papillär; Entität:1 =Papillenkarcinom, 2 =Papillenkarcinom + Adenom, 3 =Papilladenom, 4 =Dünndarmkarzinom, 5 =Dünndarmkarzinom + Adenom, 6 =Dünndarmadenom; k.A.: keine Angabe; Vitalstatus: 0=lebt; 1=tumorbedingt verstorben

6.2.2 Methylierung, Mikrosatellitenanalyse, FISH

Nummer	1 Ca				ca-ass-Ad				r-Ad	
	p16 ^{INK4a} -Meth	pkyl1	D9S304	p16 ^{INK4a} -FISH	P16-Meth	pkyl1	D9S304	p16 ^{INK4a} -Meth	pkyl1	D9S304
1		NA	I	0,94						
2		NI	I							
3		NI	I	0,92						
4										
5		I	I			I	I			
6								0	MSI	MSI
7									I	I
8		NI	I							
9		I	MSI	1,52						
10		NI	I	0,00						
11						I	I			
12	2	NI	I	1,62	2	NI	I			
13	3	NI	I	1,44						
14						I	I			
15									I	I
16		NI	NA	1,26		NI	NI			
17		I	NI	0,80						
18				0,82		I	I			
19	0	LOH	I	1,56	0	LOH	I			
20		I	I	1,50		I	I			
21									MSI	MSI
22		LOH	NI							
23	n a	I	MSI	0,02						
24	1	I	NI		0	I	NI			
25		MSI	I			NI	I			
26		NI	NI			NI	NI			
27		I	I	0,00		I	I			
28		NA	MSI							
29				1,84		NI	I			
30									I	I
31	0	I	I	1,44						
32	0	NI	NI	1,38						
33		I	I	0,94						
34		I	NA	1,38		I	NA			
35	0	LOH	LOH	1,52	n a	LOH	LOH			

36		NI	I	2,26		NI	I			
37		I	I	1,64		I	I			
38		NI	I							
39		I	I	1,60						
40		I	I	1,68		I	I			
41		NA	I	0,88		NA	NA			
42	0	NI	I	1,22	n a	NI	I			
43		I	NI							
44	0	LOH	I	0,68						
45								0	NI	I
46	0	LOH	I							
47	0	I	LOH		0	I	LOH			
48		I	I	0,72						
49										
50									I	NI
51		NA	MSI	1,32						
52	0	MSI	MSI	1,48	0					
53		I	I	2,52						
54		NI	I	1,52						
55		NI	NI	0,00		NI	NI			
56		NA	NA			NA	NA			
57		I	I	0,84						
58		NI	I	1,92						
59		I	I	2,38						
60									NI	LOH
61		NI	NI	0,98		NI	NI			
62									I	I
63		NI	I	0,00						
64		NI	I	1,22						
65		I	I							
66		NI	NA	0,00						
67		NI	I	1,86						
68		NI	I	0,80						
69		NA	MSI	0,68						
70	0	LOH	LOH	1,76	0	LOH	LOH			
71		NI	I	0,82						
72		I	I	1,50		I	I			
73		I	I	1,34						
74		NI	I	1,32		NI	I			
75	0	NI	MSI							
76		NA	NA	0,86		NA	NA			
77									LOH	I
78		LOH	I	1,00						
79	0	NI	I	1,58						
80		I	I							
81		NA	NA	1,12						
82		NI	I			NI	I			
83		I	I	0,36						
84		I	I	1,44		I	I			
85		NI	I	0,96		NI	I			
86									NI	I
87	2	MSI	MSI	1,74						

88		NI	I	1,48		NI	I			
89	2	I	MSI	1,84						
90		I	I			I	I			
91									NI	I
92									I	I
93		I	I	0,00		I	I			
94										
95	n a	I	MSI	1,60	n a	I	MSI			
96									NI	I
97		NI	LOH			MSI	LOH			
98									NI	I
99		I	I	0,64						
100		NA	LOH	1,08		NA	LOH			
101									I	I
102		NI	I	0,16						
103		NI	I	0,96		NI	I			
104		NI	NA			NI	2 x n a			
106		I	LOH							
107	0	LOH	LOH	0,74	0	LOH	NA			
108		NI	NI	1,60		NI	NI			
109	0/1	MSI	I	1,30	0/1	MSI	I			
110									I	I
111		LOH	MSI	1,32		LOH	MSI			
112	2	MSI	MSI	1,62						
113									NA	NA
114									NI	I
115									I	I
117		I	I	0,30		I	I			
118	3			1,40						
119									I	I
120									MSI	I
121									NI	I
122	n a	NA	NA	1,70						
123		NI	I							
125		NA	NA	1,72		NA	NA			
127		I	I							
128									NI	I
129		I	I	1,12		I	I			
130		NI	I			NI	I			
131		I	NI							
132										I
133		LOH	I		0	I	I			
141									I	NI
143		I	I			I	I			
145		I	NA							
146		I	I	0,96						
147		LOH	LOH	1,84						
148		I	I							
149						I	NI			
150		NI	NI							
151		NI	I	0,82		NI	I			
152		I	I	1,74						

153		I	I			I	I			
154		I	NI	2,00		I	NI			
155		I	NA	2,04						
156		NA	I							
157		NI	NA	1,54						
158		NI	I	1,00						
160		NI	I	1,00						
161		NI	I	0,14		NI	I			
162		I	NI	1,54		I	NI			
163		NI	I			NI	I			
164		NI	I			NI	I			
165		I	NI			I	NI			
166		NA	NA			NA	NA			
167		I	MSI	0,96		I	MSI			
168									I	I
169		NI	I							
171		LOH	MSI	0,80		LOH	MSI			
172		I	I							
173		I	I							
174		NI	I							
175		NA	I							
176		I	I							
177		I	I							
178		NI	NI			NI	NI			
179		NA	NA							
180		NI	I	1,60		NI	I			
181		LOH	I			LOH	I			
183		I	I							
184									NI	MSI
185									NI	I
186									I	I
187									I	I
188									I	I
189									NI	I
190									NI	MSI
191									I	I
192		I	I	1,80						
193		NI	MSI	1,60						
194		I	I	1,28						
195		I	I	0,90						
196		I	I	1,40						
197		I	NI	1,34		I	NI		I	NI
198									I	MSI
199									NI	I
200		NI	I			NI	I			
201										
202		NI	LOH			NI	LOH		NI	I
203										
205		NI	NI							
206		I	I							
207		I	NI							
208		NI	I							

209		I	I							
210		MSI	MSI							
211		LOH	I							
212		NI	MSI							
213		NA	I			NA	LOH			
214		I	I			I	I			
215		NI	I							
216		NI	I							
217		I	I			I	I			
218		NI	NI							
219		LOH	NI							
220		I	I	1,32						
221		NI	I							
222								I	I	
223								I	I	
227		I	I			I	I			
228		I	I			I	I			
229		I	I			I	I			
230		I								
231								NI	I	
232						NI	I			
234				1,80						
235				0,08						
236				1,40						
237				1,74						
238										
239										
240				0,06						
241				0,14						
242										
243				1,58						
244				1,62						
245										
246										
247				1,50						
248				1,56						
249				1,14						
250		NA	NA			I	NA			
251		I	I	0,28						
253		NA	NA	1,74		NA	NA			
254		I	I	1,44						
255		NI	NI							
257		NI	I	1,34						
258		LOH	NI							
259			NA	3,20			NA			
260		NI	I	1,80						
261		I	NI	1,70						
262		LOH	I	1,36						
264		NI	LOH	1,60						
266		I	I			NA	NA			
267			I	1,92		I	I			
268		I	NI	0,04						

269		NI	NI	1,06		NI	NI			
270		I	I	1,60		I	I			
271		NI	LOH	1,52						
272		LOH	I	1,44		NA	NA			
273		I	I			I	I			
274			MSI	1,32						
275		NA	I	0,92						
276		NA	NA							
277		I	I	1,80						
278		I	I	1,04		I	I			
279		LOH	I	1,74			I			
280		NA	NA	1,60						

Methylierung: 0= unmethyliert, 1=leicht methyliert, 2= zur Hälfte methyliert, 3 = vollständig methyliert; Mikrosatellitenanalyse: NA= nicht auswertbar, NI=nicht informativ, I= informativ, MSI= mikrosatelliteninstabil, LOH= Loss of Heterozygosity; NA = nicht auswertbar

6.2.3 Immunhistologie

	No		1 Ca		ca-ass-Ad		r-Ad	
Nummer	Intensität	Prozent	Intensität	Prozent	Intensität	Prozent	Intensität	Prozent
1			0	0				
2	0	0	3	90				
3	0	0	0	0				
4								
5	0	0	0	0	0	0		
6							0	0
7								
8	0	0	2	80				
9								
10			0	0				
11	1	1			2	30		
12	0	0	0	0	2	10		
13	0	0	1	1				
14								
15							1	1
16	1	50			0	0		
17			0	0				
18	1	2	0	0	0	0		
19	2	10	2	5	2	5		
20	1	1	2	2				
21								
22								
23	2	1						
24	2	50	0	0	0	0		
25			0	0				
26	1	2	0	0	0	0		
27					0	0		
28								

29	1	1	2	40	1	1		
30	1	1	2	50				
31	1	1	2	1	1	1		
32	1	1	3	100	3	30		
33	1	1	0	0				
34			0	0	0	0		
35	1	1	3	100	1	70		
36	1?	1?	0	0	0	0		
37	1	1	2	40	2	50		
38	1	1	0	0	0	0		
39	1	1	1	1				
40	1	1	1	1	2	50		
41	1	1	3	30	2	20		
42	1	1	3	100				
43			0	0	0	0		
44								
45							3	60
46	0	0						
47								
48	1	1	3	50				
49	1	1						
50	1	1			0	0		
51	1	1	0	0				
52	1	1	0	0				
53	1	1	1	1				
54	1	1	1	10				
55			0	0	0	0		
56	1	1						
57	1	1	1	30				
58	1	1	0	0				
59	1	1	3	30				
60	1	1					1	10
61	1	1			0	0		
62							2	10
63	1	1	0	0				
64	1	1	1	1				
65			1	1				
66	1	1	0	0				
67	1	1	0	0				
68	1	1	1	1				
69	1	1	0	0				
70	0	0	0	0	2	30		
71	1	1	1	20				
72	1	1	0	0	0	0		
73	1	1	2	80				
74			0	0	2	5		
75	1	1						
76	1	1	1	1	1	1		
77	0	0	0	0				
78	1	1	3	30	3	20		
79			3	30				
80	1	1						

81	1	1	1	10				
82	1	1					1	1
83	1	1	0	0				
84	1	1	0	0				
85	1	1	2	80				
86	1	1					2	20
87	1	1	0	0				
88					1	1		
89								
90								
91								
92	1	1					2	30
93	1	1	0	0	0	0		
94								
95			2	30	2	20		
96	1	1					1	1
97	1	1	0	0	0	0		
98	1	1					2	10
99	1	1	1	20				
100	1	1	1	1	1	10		
101	1	1					0	0
102	0	0	0	0				
103	1	1	2	5	1	1		
104	1	1	3	100				
106								
107	1	1	0	0	3	60		
108	1	1	3	50	2	50		
109	1	1	3	30	2	2		
110	1	1					1	40
111	1	1	3	3	2	1		
112	1	1						
113	1	1					1	40
114	1	1					3	80
115								
117	1	1	0	0	0	0		
118	0	0	1	5				
119	1	1						
120	1	1					3	40
121							3	70
122	1	1	3	40	1	1		
123	1	1	3	30				
125	1	1	3	20	1	10		
127	1	1	1	10				
128	1	1					0	0
129	1	1			0	0		
130	1	1	0	0	0	0		
131			1	1				
132								
133	1	1			2	10	0	0
141								
143	1	1	1	1	1	1		
145	1	1	3	50				

146	1	1	3	80				
147	1	1	3	90				
148			0	0				
149	1	1						
150	1	1	3	50				
151			3	50				
152								
153			2	2	2	1		
154	1	1	0	0	0	0		
155	1	1	1	1				
156	1	1	0	0				
157	1	1	3	30				
158			3	100				
160	1	1	0	0				
161	1	1	1	1				
162	1	1	2	1	3	30		
163	1	1	0	0	0	0		
164	1	1	1	5	3	30		
165	1	1	1	10	0	0		
166	0	0	0	0				
167	1	1	2	70	1	5		
168	2	80					2	80
169								
171	1	1	2	30	1	10		
172	1	10	1	1				
173	1	1	2	90				
174			0	0				
175			0	0				
176								
177			2	50				
178					0	0		
179	1	1	0	0				
180			1	10				
181								
183	1	1	1	10	1	1		
184								
185								
186								
187								
188	1	1					0	0
189								
190								
191								
192	1	1	1	1				
193	1	1	3	5				
194	1	1	0	0				
195	1	1	3	90				
196	1	1	0	0	0	0		
197	1	1	2	70	2	70	2	1
198	1	1						
199	1	1					2	1
200								

201								
202	1	1	3	100	3	100	1	10
203								
205			3	70				
206	1	1	0	0				
207	1	1	2	60				
208	1	1						
209			0	0				
210	1	1	3	30				
211	1	1	0	0				
212	1	1	2	90				
213								
214	1	1	0	0				
215								
216	1	1	3	30				
217	1	1			0	0		
218			0	0	0	0		
219	1	1	0	0				
220	1	1	1	1				
221								
222	1	1						
223							2	10
227	1	1						
228	1	1						
229	1	1	0	0	0	0		
230	1	1	0	0				
231	1	1					3	20
232	1	1	3	30				
234			3	100				
235			0	0				
236					0	0		
237			1	1				
238			0	0				
239			0	0				
240			0	0				
241			0	0				
242			0	0				
243			3	90				
244			3	70				
245			0	0				
246			0	0				
247			1	10				
248			0	0				
249			1	10				
250			1	10	2	40		
251			0	0				
253			2	10	2	50		
254			0	0				
255								
257			0	0				
258			0	0				
259			1	10	2	20		

260			0	0				
261			2	70				
262			0	0				
264			0	0				
266			0	0				
267					1	1		
268			0	0				
269			0	0	0	0		
270			3	30				
271			0	0				
272			1	10	1	10		
273			3	100				
274								
275			1	10				
276								
277			1	1				
278			0	0	0	0		
279			1	5	0	0		
280			0	0				

Intensität: 0: keine Färbung, 1: schwache Färbung, 2: mittlere Färbung, 3: starke Färbung

6.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFIP: Armed Forces Institute of Pathology
Ad: Adenom
APC : Adenomatous Polyposis Coli
APS : Ammoniumpersulfat
Aqua dest.: Aqua destillata
Ca: Karzinom
ca-ass-Ad: karzinomassoziiertes Adenom
Ca-ex-Ad: Ex-Adenom-Karzinom
CDK: Cyclin Dependant Kinase
CDK4: Cyklin Dependant Kinase 4
CDKN2: Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2
CIS: Carcinoma in Situ
CKI: Cyklin Dependant Kinase Inhibitor
CpG: Cytosin-phosphitydyl-Guanosin
DAPI: Diamino-Phenyl-Indol
DNA: Desoxyribonucleinacid
DNMT: DNA-Methyltransferase
DNTPs: Desoxyribonucleosidtriphosphat
E2F: E2 Promotor Binding Factor
EDTA: Ethylen Diamin Tetra Acetat
EDV: elektronische Datenverarbeitung
EMT: epitheliale-mesotheliale Transition
ERCP: Endoskopische Retrograde Cholangiopankreatographie
FAP: familiäre adenomatöse Polyposis
FISH: Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
HE: Hämatoxylin-Eosin
HG-IEN: high-grade intraepitheliale Neoplasie
HNPCC: hereditäre non-polypöse colorectale Carcinome
HPV: humanes Papilloma-Virus
LOH: Loss of Heterozygosity
MAP: Mitogen activated protein
MET: mesotheliale-epitheliale Transition

MSI: Mikrosatelliteninstabilität
MSI-Analyse: Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse
MS-PCR: Methylierungsspezifische PCR
MSS, NI: nicht-informativer mikrosatellitenstabiler Allelstatus
MSS: mikrosatellitenstabiler Allelstatus in der MSI-Analyse
n= Anzahl
NI: nicht-informativer Allelstatus in der MSI-Analyse
No: Normalgewebe
p= p-Wert
PAA: Polyacrylamid
PCR: Polymerase Chain Reaction
pRB: phosphoryliertes Retinoblastomprotein
r-Ad: reines Adenom
RB: Retinoblastomprotein
ROH: Retention of Heterozygosity
Rpm: Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SAM: S-Adenosyl-Methionin
SSC: Saline Sodium Citrate
Taq(-Polymerase): Thermus aquaticus-Polymerase
TBE: Tris-Borsäure-EDTA
TEMED: Tetramethylenethyldiamin
TE-Puffer: Tris-EDTA-Puffer
TMA: Tissue Micro Array
TNM-Klassifikation: Tumor Nodes Metastases-Klassifikation
TrKR: Thyrosinkinaserzeptor
TßR2 :Transforming Growth-Factor-beta Receptor 2
UICC: Union Internationale contre le Cancer
WHO: World Health Organisation

6.4 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Zhou H, Schaefer N, Wolff M, Fischer HP. Carcinoma of the ampulla of Vater: comparative histologic/immunohistochemical classification and follow-up. *Am J Surg Pathol.* 2004; 28: 875-82.
- [2] Fenoglio-Preiser C PR, Perzin, KH. Anatomy of the small and large intestines and anal canal. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1990
- [3] Esposito I, Friess H, Buchler MW. Carcinogenesis of cancer of the papilla and ampulla: pathophysiological facts and molecular biological mechanisms. *Langenbecks Arch Surg.* 2001; 386: 163-71.
- [4] Schiebler Th SW, Zilles K. Anatomie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1999
- [5] Fischer HP, Zhou H. [Pathogenesis and histomorphology of ampullary carcinomas and their precursor lesions. Review and individual findings]. *Pathologe.* 2003; 24: 196-203.
- [6] Albores-Saavedra J. Tumors of the gallbladder, extrahepatic bile ducts and ampulla of vater. Washington, D.C.: Armed Forces Insitute of Pathology, 1998
- [7] Costi R, Caruana P, Sarli L, Violi V, Roncoroni L, Bordi C. Ampullary adenocarcinoma in neurofibromatosis type 1. Case report and literature review. *Mod Pathol.* 2001; 14: 1169-74.
- [8] Kamisawa T, Tu Y, Egawa N, et al. Clinicopathologic features of ampullary carcinoma without jaundice. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40: 162-6.
- [9] Stolte M, Pscherer C. Adenoma-carcinoma sequence in the papilla of Vater. *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31: 376-82.
- [10] Wittekind CH. MHJ, Bootz F. . TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage edn. Berlin, Heidelberg, New York: Springer
- [11] Hamilton S.R. ALA. Tumours of the Digestive System: World Health Organisation
- [12] Böcker W. Pathologie. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 2001
- [13] Galle TS, Juel K, Bulow S. Causes of death in familial adenomatous polyposis. *Scand J Gastroenterol.* 1999; 34: 808-12.
- [14] Iwama T, Mishima Y, Utsunomiya J. The impact of familial adenomatous polyposis on the tumorigenesis and mortality at the several organs. Its rational treatment. *Ann Surg.* 1993; 217: 101-8.
- [15] Mecklin JP, Jarvinen HJ, Virolainen M. The association between cholangiocarcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer.* 1992; 69: 1112-4.
- [16] Tran TC, Vitale GC. Ampullary tumors: endoscopic versus operative management. *Surg Innov.* 2004; 11: 255-63.
- [17] Martin JA, Haber GB. Ampullary adenoma: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2003; 13: 649-69.
- [18] Bohnacker S, Soehendra N, Maguchi H, Chung JB, Howell DA. Endoscopic resection of benign tumors of the papilla of vater. *Endoscopy.* 2006; 38: 521-5.
- [19] Klempa I, Arnold W. [Palliative surgical and endoscopic therapy of malignant bile duct occlusion]. *Chirurg.* 1994; 65: 836-48.
- [20] Miniello S, Testini M, Piccinni G, et al. [The role of palliation in peri-ampullar tumors in the elderly]. *Ann Ital Chir.* 2003; 74: 251-4.
- [21] Lesurtel M, Dehni N, Tiret E, Parc R, Paye F. Palliative surgery for unresectable pancreatic and periampullary cancer: a reappraisal. *J Gastrointest Surg.* 2006; 10: 286-91.
- [22] Kayahara M, Nagakawa T, Ohta T, Kitagawa H, Miyazaki I. Surgical strategy for carcinoma of the papilla of Vater on the basis of lymphatic spread and mode of recurrence. *Surgery.* 1997; 121: 611-7.

- [23] Yamaguchi K, Enjoji M. Carcinoma of the ampulla of Vater. A clinicopathologic study and pathologic staging of 109 cases of carcinoma and 5 cases of adenoma. *Cancer*. 1987; 59: 506-15.
- [24] Yamauchi H, Nitta A, Namiki T. Carcinoma of the papilla of Vater accompanied by non-invasive adenomatous component (NAC). *Tohoku J Exp Med*. 1993; 170: 147-56.
- [25] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2042-54.
- [26] Buselmaier. *Biologie für Mediziner*, 8. Auflage edn. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1998
- [27] Hiddemann H, Bartram. *Die Onkologie*. Berlin, Heidelberg, New-York: Springer
- [28] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999; 21: 163-7.
- [29] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 415-28.
- [30] Antequera F, Bird A. CpG islands. *EXS*. 1993; 64: 169-85.
- [31] Feinberg AP, Vogelstein B. Alterations in DNA methylation in human colon neoplasia. *Semin Surg Oncol*. 1987; 3: 149-51.
- [32] Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*. 1985; 228: 187-90.
- [33] Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*. 1998; 20: 116-7.
- [34] Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999; 402: 187-91.
- [35] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999; 99: 247-57.
- [36] Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*. 1999; 99: 451-4.
- [37] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001; 293: 1074-80.
- [38] Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1: 157-62.
- [39] Tischfield JA. Loss of heterozygosity or: how I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *Am J Hum Genet*. 1997; 61: 995-9.
- [40] Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*. 1998; 396: 177-80.
- [41] Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, et al. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 11563-8.
- [42] Chung CH, Wilentz RE, Polak MM, et al. Clinical significance of K-ras oncogene activation in ampullary neoplasms. *J Clin Pathol*. 1996; 49: 460-4.
- [43] Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C, Paty PB, Park PY, Brennan MF. K-ras mutation in adenomas and carcinomas of the ampulla of Vater. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 129-33.
- [44] Imai Y, Oda H, Tsurutani N, Nakatsuru Y, Inoue T, Ishikawa T. Frequent somatic mutations of the APC and p53 genes in sporadic ampullary carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 1997; 88: 846-54.
- [45] Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, et al. Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2001; 84: 253-62.
- [46] Zhao B, Kimura W, Futakawa N, et al. p53 and p21/Waf1 protein expression and K-ras codon 12 mutation in carcinoma of the papilla of Vater. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94: 2128-34.

- [47] Park SH, Kim YI, Park YH, et al. Clinicopathologic correlation of p53 protein overexpression in adenoma and carcinoma of the ampulla of Vater. *World J Surg.* 2000; 24: 54-9.
- [48] Takashima M, Ueki T, Nagai E, et al. Carcinoma of the ampulla of Vater associated with or without adenoma: a clinicopathologic analysis of 198 cases with reference to p53 and Ki-67 immunohistochemical expressions. *Mod Pathol.* 2000; 13: 1300-7.
- [49] Younes M, Riley S, Genta RM, Mosharaf M, Mody DR. p53 protein accumulation in tumors of the ampulla of Vater. *Cancer.* 1995; 76: 1150-4.
- [50] Achille A, Scupoli MT, Magalini AR, et al. APC gene mutations and allelic losses in sporadic ampullary tumours: evidence of genetic difference from tumours associated with familial adenomatous polyposis. *Int J Cancer.* 1996; 68: 305-12.
- [51] Imai Y, Tsurutani N, Oda H, Inoue T, Ishikawa T. Genetic instability and mutation of the TGF-beta-receptor-II gene in ampullary carcinomas. *Int J Cancer.* 1998; 76: 407-11.
- [52] Zhu L, Kim K, Domenico DR, Appert HE, Howard JM. Adenocarcinoma of duodenum and ampulla of Vater: clinicopathology study and expression of p53, c-neu, TGF-alpha, CEA, and EMA. *J Surg Oncol.* 1996; 61: 100-5.
- [53] Ye SC, Foster JM, Li W, et al. Contextual effects of transforming growth factor beta on the tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 1999; 59: 4725-31.
- [54] Leone G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature.* 1997; 387: 422-6.
- [55] Matsubayashi H, Watanabe H, Yamaguchi T, et al. Differences in mucus and K-ras mutation in relation to phenotypes of tumors of the papilla of vater. *Cancer.* 1999; 86: 596-607.
- [56] Scarpa A, Capelli P, Zamboni G, et al. Neoplasia of the ampulla of Vater. Ki-ras and p53 mutations. *Am J Pathol.* 1993; 142: 1163-72.
- [57] Scarpa A, Zamboni G, Achille A, et al. ras-family gene mutations in neoplasia of the ampulla of Vater. *Int J Cancer.* 1994; 59: 39-42.
- [58] Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T, Nagata Y, Urano T, Shiku H. Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirsten-ras oncogene. *Ann Surg.* 1991; 214: 657-62.
- [59] Toyooka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Iwama T, Miyaki M. Somatic mutations of the adenomatous polyposis coli gene in gastroduodenal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 1995; 55: 3165-70.
- [60] Ebert MP, Hoffmann J, Schneider-Stock R, et al. Analysis of K-ras gene mutations in rare pancreatic and ampullary tumours. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1998; 10: 1025-9.
- [61] Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol.* 1999; 187: 112-26.
- [62] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; 88: 323-31.
- [63] Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003; 2: 7.
- [64] Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 4238-52.
- [65] Kolligs FT, Hu G, Dang CV, Fearon ER. Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 5696-706.
- [66] Rubinfeld B, Souza B, Albert I, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science.* 1993; 262: 1731-4.
- [67] Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science.* 1997; 275: 1784-7.
- [68] Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997; 275: 1787-90.

- [69] Riese J, Yu X, Munnerlyn A, et al. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell*. 1997; 88: 777-87.
- [70] Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005; 179: 56-65.
- [71] Fischer HP, Zhou H. Pathogenesis of carcinoma of the papilla of Vater. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2004; 11: 301-9.
- [72] Geradts J, Wilentz RE, Roberts H. Immunohistochemical [corrected] detection of the alternate INK4a-encoded tumor suppressor protein p14(ARF) in archival human cancers and cell lines using commercial antibodies: correlation with p16(INK4a) expression. *Mod Pathol*. 2001; 14: 1162-8.
- [73] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993; 366: 704-7.
- [74] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994; 264: 436-40.
- [75] Chapman EJ, Harnden P, Chambers P, Johnston C, Knowles MA. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 5740-7.
- [76] Ueki T, Hsing AW, Gao YT, et al. Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 1717-25.
- [77] Hong SM, Choi J, Ryu K, Ro JY, Yu E. Promoter hypermethylation of the p16 gene and loss of its protein expression is correlated with tumor progression in extrahepatic bile duct carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130: 33-8.
- [78] Caca K, Feisthammel J, Klee K, et al. Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2002; 97: 481-8.
- [79] Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1378: F115-77.
- [80] Ishikawa A, Sasaki M, Sato Y, et al. Frequent p16ink4a inactivation is an early and frequent event of intraductal papillary neoplasm of the liver arising in hepatolithiasis. *Hum Pathol*. 2004; 35: 1505-14.
- [81] Chen J, Goligorsky MS. Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H1729-39.
- [82] Zhang Z, Rosen DG, Yao JL, Huang J, Liu J. Expression of p14ARF, p15INK4b, p16INK4a, and DCR2 increases during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. 2006; 19: 1339-43.
- [83] Incles CM, Schultes CM, Kempfski H, Koehler H, Kelland LR, Neidle S. A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3: 1201-6.
- [84] Plath T, Detjen K, Welzel M, et al. A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor. *J Cell Biol*. 2000; 150: 1467-78.
- [85] Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2001; 264: 42-55.
- [86] Harada H, Nakagawa K, Iwata S, et al. Restoration of wild-type p16 down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human gliomas. *Cancer Res*. 1999; 59: 3783-9.
- [87] Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, McKee PH, Rheinwald JG. Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell

- carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol.* 2003; 163: 477-91.
- [88] Hsieh CJ, Klump B, Holzmann K, Borchard F, Gregor M, Porschen R. Hypermethylation of the p16INK4a promoter in colectomy specimens of patients with long-standing and extensive ulcerative colitis. *Cancer Res.* 1998; 58: 3942-5.
- [89] Klump B, Hsieh CJ, Dette S, et al. Promoter methylation of INK4a/ARF as detected in bile-significance for the differential diagnosis in biliary disease. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 1773-8.
- [90] Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K, Gregor M, Porschen R. Hypermethylation of the CDKN2/p16 promoter during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 1998; 115: 1381-6.
- [91] Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ. Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Oncogene.* 1996; 13: 1867-73.
- [92] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 9821-6.
- [93] Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996; 274: 1672-7.
- [94] Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res.* 1994; 54: 5816-20.
- [95] Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995; 55: 4525-30.
- [96] Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994; 8: 15-21.
- [97] Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 1997; 57: 3126-30.
- [98] Liu Q, Yan YX, McClure M, Nakagawa H, Fujimura F, Rustgi AK. MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene.* 1995; 10: 619-22.
- [99] Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, et al. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 1688-97.
- [100] Burri N, Shaw P, Bouzourene H, et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer. *Lab Invest.* 2001; 81: 217-29.
- [101] Wong YF, Chung TK, Cheung TH, et al. Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy. *Cancer Lett.* 1999; 136: 231-5.
- [102] Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT. Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor gene in gastrinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 4146-56.
- [103] Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 153-9.
- [104] Tannapfel A, Benicke M, Katalinic A, et al. Frequency of p16(INK4A) alterations and K-ras mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma of the liver. *Gut.* 2000; 47: 721-7.
- [105] Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, et al. Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 638-45.
- [106] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002; 21: 5427-40.
- [107] Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, et al. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 299-304.

- [108] Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, et al. Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *J Pathol.* 2003; 201: 487-95.
- [109] Gessner C, Liebers U, Kuhn H, et al. BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J.* 2002; 19: 134-40.
- [110] Seike M, Gemma A, Hosoya Y, et al. Increase in the frequency of p16INK4 gene inactivation by hypermethylation in lung cancer during the process of metastasis and its relation to the status of p53. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4307-13.
- [111] Hilton DA, Penney M, Evans B, Sanders H, Love S. Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26: 472-8.
- [112] Makitie AA, MacMillan C, Ho J, et al. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 2177-84.
- [113] Semczuk A, Boltze C, Marzec B, Szczypińska A, Roessner A, Schneider-Stock R. p16INK4A alterations are accompanied by aberrant protein immunostaining in endometrial carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003; 129: 589-96.
- [114] Omura-Minamisawa M, Diccianni MB, Chang RC, et al. p16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 3481-90.
- [115] Ichikawa K, Imura J, Kawamata H, Takeda J, Fujimori T. Down-regulated p16 expression predicts poor prognosis in patients with extrahepatic biliary tract carcinomas. *Int J Oncol.* 2002; 20: 453-61.
- [116] Parwani AV, Geradts J, Caspers E, et al. Immunohistochemical and genetic analysis of non-small cell and small cell gallbladder carcinoma and their precursor lesions. *Mod Pathol.* 2003; 16: 299-308.
- [117] DeHaan RD, Kipp BR, Smyrk TC, Abraham SC, Roberts LR, Halling KC. An assessment of chromosomal alterations detected by fluorescence in situ hybridization and p16 expression in sporadic and primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinomas. *Hum Pathol.* 2007; 38: 491-9.
- [118] Brucher BL, Geddert H, Langner C, et al. Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14(ARF), p16(INK4A) and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel. *Int J Cancer.* 2006; 119: 1298-302.
- [119] Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 2003; 163: 1101-7.
- [120] Kim BN, Yamamoto H, Ikeda K, et al. Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. *Int J Oncol.* 2005; 26: 1217-26.
- [121] Rosty C, Geradts J, Sato N, et al. p16 Inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) arising in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27: 1495-501.
- [122] Maitra A, Adsay NV, Argani P, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol.* 2003; 16: 902-12.
- [123] Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Appl.* 1994; 3: S113-22.
- [124] Shibata A, Ohneseit PF, Tsai YC, et al. Mutational spectrum in the p53 gene in bladder tumors from the endemic area of black foot disease in Taiwan. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 1085-7.
- [125] Sambrook.

- [126] Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 1991; 48: 137-44.
- [127] Vogt T, Stolz W, Landthaler M, Ruschoff J, Schlegel J. Nonradioactive arbitrarily primed polymerase chain reaction: a novel technique for detecting genetic defects in skin tumors. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 194-7.
- [128] Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 1997; 57: 4749-56.
- [129] Ruschoff J, Dietmaier W, Bocker T, et al. [Molecular cancer disposition diagnosis exemplified by colorectal carcinoma. What is the contribution of pathology?]. *Pathologe.* 1998; 19: 269-78.
- [130] Bohm M, Wieland I, Schutze K, Rubben H. Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am J Pathol.* 1997; 151: 63-7.
- [131] Beecher-Instruments. MTA1 Manual-Tissue Arrayer 1. 2007.
- [132] Vysis. http://www.vysis.com/FISH_35649.asp 27.06.2007. 2007.
- [133] Hopman AH, Moesker O, Smeets AW, Pauwels RP, Vooijs GP, Ramaekers FC. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1991; 51: 644-51.
- [134] Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, et al. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry.* 1988; 89: 307-16.
- [135] Sauter G, Moch H, Carroll P, Kerschmann R, Mihatsch MJ, Waldman FM. Chromosome-9 loss detected by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer. *Int J Cancer.* 1995; 64: 99-103.
- [136] Wheelless LL, Reeder JE, Han R, et al. Bladder irrigation specimens assayed by fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei. *Cytometry.* 1994; 17: 319-26.
- [137] Schwarz S, Rechenmacher M, Filbeck T, et al. Value of multicolor Fluorescence in situ hybridization (UroVysion-TM) in the differential diagnosis of flat urothelial lesions. *J Clin Pathol.* 2007.
- [138] Schwarz S, Rechenmacher M, Filbeck T, et al. Value of multicolour fluorescence in situ hybridisation (UroVysion) in the differential diagnosis of flat urothelial lesions. *J Clin Pathol.* 2008; 61: 272-7.
- [139] Gründobler B. Molekularpathologische Untersuchungen bei Tumoren der Papilla Vateri: immunhistochemische Subtypisierung, Aneuploidie und Mikrosatelliteninstabilität. 2008.
- [140] Schwarz S, Rechenmacher M, Lottner C, et al. [FISH analysis in the differential diagnosis of flat urothelial lesions using tissue microarrays]. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2004; 88: 184-93.
- [141] Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. *Am J Pathol.* 1996; 149: 1193-9.
- [142] Ventura RA, Martin-Subero JJ, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn.* 2006; 8: 141-51.
- [143] Wilkens L, Gerr H, Gadzicki D, Kreipe H, Schlegelberger B. Standardised fluorescence in situ hybridisation in cytological and histological specimens. *Virchows Arch.* 2005; 447: 586-92.
- [144] Hartmann A. Tissue microarray studies in bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2008: 141-6.

- [145] Uzawa N, Sonoda I, Myo K, Takahashi K, Miyamoto R, Amagasa T. Fluorescence in situ hybridization for detecting genomic alterations of cyclin D1 and p16 in oral squamous cell carcinomas. *Cancer*. 2007; 110: 2230-9.
- [146] Schwarz S, Bier J, Driemel O, et al. Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis. *Cytometry A*. 2008; 73: 305-11.
- [147] NCBI. Homo sapiens (human) genome view. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606, 2009.
- [148] NCBI. D9S304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/stscgi?uid=57980>, 2009.
- [149] NCBI. D9S1751. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/stscgi?uid=154085>, 09.
- [150] Vysis. Urovysion Bladder Cancer Recurrence Kit. <http://www.vysis.com/PDF/UroVysionKitBrochurepdf>, 2009.
- [151] NCBI. Entrez Gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>, 2009.
- [152] Savola S, Nardi F, Scotlandi K, Picci P, Knuutila S. Microdeletions in 9p21.3 induce false negative results in CDKN2A FISH analysis of Ewing sarcoma. *Cytogenet Genome Res*. 2007; 119: 21-6.
- [153] Okami K, Cairns P, Westra WH, et al. Detailed deletion mapping at chromosome 9p21 in non-small cell lung cancer by microsatellite analysis and fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer*. 1997; 74: 588-92.
- [154] Abbot. Probe Map. http://internationalabbottmolecular.com/Images/ProbeMaps/Map2600_1.gif, 2009.
- [155] Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*. 2006; 127: 265-75.
- [156] Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, et al. Genetic and epigenetic alterations of the INK4a-ARF pathway in cholangiocarcinoma. *J Pathol*. 2002; 197: 624-31.
- [157] Tadokoro H, Shigihara T, Ikeda T, Takase M, Suyama M. Two distinct pathways of p16 gene inactivation in gallbladder cancer. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 6396-403.
- [158] NCBI. MTAP methylthioadenosine phosphorylase [Homo sapiens]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4507&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2PEntrezGeneGene_ResultsPanelGene_RVDocSum, 2008.
- [159] NCBI. BCL2-associated athanogene. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=573, 2008.
- [160] Sasaki M, Ikeda H, Haga H, Manabe T, Nakanuma Y. Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. *J Pathol*. 2005; 205: 451-9.
- [161] Queiroz C, Silva TC, Alves VA, et al. P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract*. 2006; 202: 77-83.
- [162] Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol*. 2007; 210: 567-74.
- [163] Keminer O, Peters R. Permeability of single nuclear pores. *Biophys J*. 1999; 77: 217-28.
- [164] Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, et al. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190: 668-73.
- [165] Tannapfel A, Engeland K, Weinans L, et al. Expression of p73, a novel protein related to the p53 tumour suppressor p53, and apoptosis in cholangiocellular carcinoma of the liver. *Br J Cancer*. 1999; 80: 1069-74.

- [166] Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K. Aberrant expression of pRb and p16(INK4), alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol.* 2004; 35: 1189-95.
- [167] Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Kanazawa H, Fukui N, Watanabe M. Abnormal expression of p16(INK4a), cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *J Surg Oncol.* 2008; 98: 60-6.
- [168] van Dekken H, Hop WC, Tilanus HW, et al. Immunohistochemical evaluation of a panel of tumor cell markers during malignant progression in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130: 745-53.
- [169] Feakins RM, Nickols CD, Bidd H, Walton SJ. Abnormal expression of pRb, p16, and cyclin D1 in gastric adenocarcinoma and its lymph node metastases: relationship with pathological features and survival. *Hum Pathol.* 2003; 34: 1276-82.
- [170] Abe K, Suda K, Arakawa A, et al. Different patterns of p16INK4A and p53 protein expressions in intraductal papillary-mucinous neoplasms and pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas.* 2007; 34: 85-91.
- [171] Murphy N, Ring M, Heffron CC, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 525-34.
- [172] Anschau F, Schmitt VM, Lambert AP, Goncalves MA, Machado DC. Transition of cervical carcinoma in situ to invasive cancer: role of p16 INK4a expression in progression and in recurrence. *Exp Mol Pathol.* 2009; 86: 46-50.
- [173] Giordano G, Azzoni C, D'Adda T, et al. Human papilloma virus (HPV) status, p16INK4a, and p53 overexpression in epithelial malignant and borderline ovarian neoplasms. *Pathol Res Pract.* 2008; 204: 163-74.
- [174] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995; 81: 323-30.
- [175] Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res.* 1994; 54: 6078-82.
- [176] Wassermann S, Scheel SK, Hiendlmeyer E, et al. p16INK4a is a beta-catenin target gene and indicates low survival in human colorectal tumors. *Gastroenterology.* 2009; 136: 196-205 e2.
- [177] Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 10356-61.
- [178] Palmqvist R, Rutegard JN, Bozoky B, Landberg G, Stenling R. Human colorectal cancers with an intact p16/cyclin D1/pRb pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol.* 2000; 157: 1947-53.
- [179] Jung A, Schrauder M, Oswald U, et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol.* 2001; 159: 1613-7.
- [180] Brabletz T, Herrmann K, Jung A, Faller G, Kirchner T. Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 2000; 156: 865-70.

6.5 DANKSAGUNG

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung vieler nicht möglich gewesen. Ich möchte mich daher bei all jenen bedanken, die zu ihrem Gelingen in vielfältiger Art und Weise beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und seine wertvollen Anregungen sowie Frau Dr. Petra Rümmele für ihre engagierte und freundschaftliche Betreuung mit vielen interessanten und persönlichen Gesprächen von denen ich sehr viel profitieren konnte.

Herrn Dr. Robert Stör möchte ich für seine Hilfe bei der Auswertung der Mikrosatellitenanalyse danken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch beim Laborteam, insbesondere Frau Monika Kerscher, Frau Nina Niessl, Frau Andrea Lieschke und Herrn Rudi Jung für ihre gründliche Einarbeitung in die verschiedenen Methoden, ihre Hilfe bei Problemen und ihre humorvolle Art bedanken, durch die die Arbeit kurzweilig war und mit großer Freude von der Hand ging.

Vielen Dank auch an meine Mitdoktoranden, insbesondere an Frau Dr. Bärbel Gründobler die nach meinem Fortgang aus Regensburg eine wichtige Brücke ins Institut bildete.

Zuletzt bedanke ich mich vielmals bei meiner Partnerin Dr. Stefanie Fertsch für die viele Geduld und ihren Zuspruch während schwieriger Zeiten, meinem Bruder Bastian für sein Verständnis wenn ich mal wieder keine Zeit für ihn hatte und seine stetige Erinnerung die Arbeit voranzubringen, meinen Eltern für ihre Unterstützung während des Studiums und ihren familiären Rückhalt während des Schreibens und auch ganz besonders meinen Großeltern, die mich während des Schreibens und der Examina in ihrer Ferienwohnung rührend umsorgt haben.